

**Univerzita Karlova v Praze
3. lékařská fakulta**

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ METABOLIZMUS
HOMOCYSTEINU U VYBRANÝCH NEMOCÍ
S KOMPLEXNÍ ETIOPATOGENEZÍ**

Dizertační práce

MUDr. Kamila Veselá

Praha 2007

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala svým školitelům Prof. MUDr. Michalu Andělovi, CSc. a Doc. MUDr. Viktoru Kožichovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a konzultace poskytované během mého doktorského studia a za trpělivost a konstruktivní kritiku při sepisování této práce.

Mé velké poděkování patří tátovi za jeho úžasnou podporu po celou dobu mého studia.

V neposlední řadě patří můj dík kolektivu laboratoře Ústavu dědičných metabolických poruch za vytvoření přátelského a tvůrčího pracovního prostředí. Dále také kolegům z Ústavu biologie a lékařské genetiky, kteří mě podporovali a umožnili mi práci dokončit. Samozřejmě také kolektivu II. interní kliniky FNKV, kde to všechno začalo a 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy, která mi toto studium umožnila.

Neocenitelnou pomocí byla také podpora přátel. Zejména děkuji Ivaně Laurichové-Barnes za veliké osobní povzbuzení a za opravu angličtiny při psaní odborných prací. Dále také děkuji Ing. Bohumile Janošikové, PhD. která mě zasvětila do tajů laboratorní práce v molekulární genetice.

OBSAH

OBSAH	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
1. ÚVOD	5
1.1 Obecná část	6
1.2 Metabolismus homocysteinu	8
1.3 Vitamíny důležité pro methioninový cyklus	13
1.4. Genetické varianty v metabolismu homocysteinu a vitamínů	17
1.5 Klinické aspekty spojené s hyperhomocysteinémií	20
1.5.1 Těžká hyperhomocysteinémie	20
1.5.2. Mírná hyperhomocysteinémie (mHcy)	21
1.5.3 Vztah komplexních nemocí a mHcy	21
2. CÍLE PROJEKTU	28
3. VÝSLEDKY A DISKUSE	30
3.1 Studie patogeneze vybraných aminthiolů v rozvoji aterogeneze	30
3.1.1 Metodologie vyšetření poruch metabolismu homocysteinu	30
3.1.2 Etiopatogeneze aterosklerozy	32
3.1.3 Léčba mírné hyperhomocysteinemie	35
3.2 Metabolismus folátů a poruchy reprodukce	37
3.2.1 Fyziologické determinanty koncentrace vybraných metabolitů	37
3.2.2 Studium etiopatogeneze vybraných vývojových vad	41
3.3 Kopie publikovaných prací	47
3.3.1 Vítová, DMEV 2001	48
3.3.2 Krupková-Meixnerová, Clinical Nutrition 2002	54
3.3.3. Janošíková, Mol Genet Metab 2003	61
3.3.4 Veselá, Physiological Research 2005	71
3.3.5. Víšková, Fetal Dian Ther 2007	83
3.3.6 Veselá, připravovaná publikace	96
3.4 Přílohy- tabulky	106
4. SOUHRN	113
5. SEZNAM PUBLIKACÍ A PRESENTACÍ K TÉMATU	115
6. CITACE	118

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CBS	Cystathionin beta-synthasa
CI	Konfidenční interval
CTH	Cystathionin gama-lyasa
DNT	Defekt neurální rubice
FOLH	Folát hydrolasa
GIT	Gastrointestinální trakt
Hey	Hymocystein
ICHS	Ischemická choroba srdeční
MTHFR	Methyltetrahydrofolát reduktasa
MTR	Methionin synthasa
MTRR	Reduktasa methionin synthesy
MZT	Methioninový zátěžový test
RFC	Redukovaný folátový přenašeč
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin
RO	Obličejové rozštěpy
THF	Tetrahydrofolát
5-MTHF	5 methyltetrahydrofolát

1. ÚVOD

V současné době dochází v medicíně k velkému rozvoji molekulárně genetických technik, které významně pomáhají objasňovat příčiny vybraných nemocí. U některých chorob je genetický podklad již dobře znám. Jedná se především o monogenně podmíněná onemocnění. Bohužel u řady onemocnění zůstává jejich genetická příčina stále neznámá. Největší skupinu tu tvoří tzv. komplexní nemoci, kde se na vzniku a rozvoji onemocnění podílejí jak faktory genetické tak negenetické. K těmto chorobám patří např. aterosklerosa, diabetes mellitus, orofaciální rozštěpy, preeklampsie, defekty neurální trubice a mnohé jiné. Komplexní onemocnění jsou závažným zdravotním a sociálním problémem ve vyspělých zemích. Objasnění všech rizikových faktorů je věnována velká pozornost, protože při znalosti těchto faktorů se nabízejí možnosti účinné prevence a léčby.

V posledních letech byly publikovány studie o vlivu zvýšené hladiny homocysteinu při rozvoji některých komplexních nemocí a metabolismu homocysteinu. Této aminokyselině je věnována velká pozornost jak na biochemické tak na molekulární úrovni. V databázi Medline je k dubnu r. 2007 uloženo více jak 12,5 tisíce článků. Vztah odborné veřejnosti k homocysteinu prochází vývojem typickým pro mnoho dalších poznatků; od nekritického přijímání, přes vášnivé odmítání, po snad již nyní zřetelnější začlenění homocysteinu mezi faktory, které spojují složité jevy interakcí genetického pozadí jedince a zevního prostředí. Cílem mé práce bylo získat nové poznatky faktorech ovlivňujících metabolismus homocysteinu s ohledem na vznik některých komplexních nemocí v české populaci.

1.1 HOMOCYSTEIN - OBECNÁ ČÁST

Homocystein je neesenciální čtyřuhlíkatá sirná aminokyselina s thiolovou funkční skupinou, která v organismu vzniká při metabolismu methioninu v tzv. methioninovém cyklu [1]. Byla objevena v roce 1932 de Vigneaudem, ale větší pozornost kliniků si získala až později, v roce 1962, kdy bylo popsáno onemocnění spojené s vysokou plazmatickou hladinou homocysteinu a jeho nadměrným vylučováním močí. Tato nemoc byla pojmenována homocystinurie [1]. Jde o onemocnění s autozomálně recesivní dědičností, podrobněji bude probráno dále. V roce 1969 popsal cévní komplikace u této choroby jako první McCully [2]. Následné experimenty na zvířatech potvrdily aterogenní vlastnosti vysokých dávek homocysteinu [3]. Homocystein však nebylo možno tehdy dostupnými technikami u člověka stanovit. Až koncem 70. let se objevily metodiky umožňující stanovení tzv. celkového homocysteinu.

Velkého zájmu odborné veřejnosti se pak homocystein dočkal v polovině 90. let, kdy byly publikovány četné studie a rozsáhlé meta-analýzy [4, 5], podle nichž již pouhé mírné zvýšení koncentrace celkového homocysteinu v krvi asociováno s výskytem aterosklerotických změn v tepnách se všemi jejich důsledky: ischemickou chorobou srdeční (ICHS), cévním onemocněním mozku (CMP), ischemickou chorobou dolních končetin (ICHDK) a opakovanými žilními trombózami u dospělé populace [4, 6]. Později přibýly studie o kauzalitě zvýšené hladiny homocysteinu s defekty neurální trubice [7, 8], o souvislosti s některými komplikacemi v těhotenství – opakovanými spontánními potraty, abrupcemi placenty [9, 10] preeklampsií [11] a rozštěpovými vadami obličeje [11, 12].

Kromě studií, které homocystein zařazovaly mezi nový nezávislý rizikový faktor pro aterosklerosu, podobný jako hypercholesterolemie, se začaly v roce 1998 [13] objevovat názory, že zvýšená hladina homocysteinu není vyvolávající příčinou aterosklerosy, ale jen sekundárním projevem při aterosklerotickém procesu. V současné době je však znovu přijímán názor o možné kauzalitě zvýšené hladiny homocysteinu a aterosklerosy, stejně tak jako jeho spoluúčast při rozvoji některých komplikací v těhotenství.

První přehledné články českých autorů věnované této tématice byly publikovány v roce 1996 [14, 15]. Byla představena homocysteinová teorie aterosklerosy, jak ji publikoval McCully, a shrnuty vybrané studie o hyperhomocysteinemii jako rizikovém faktoru ICHS, ICHDK, CMP a defektů neurální trubice. Byly zde představeny možnosti ovlivnění homocysteinu vitaminoterapií a dietními opatřeními.

Od roku 1997 bylo publikováno mnoho klinických studií prováděných u pacientů s ICHS, ICHDK či u gravidních žen z České republiky; výsledky studií potvrzovaly závěry zahraničních studií o kauzalitě zvýšené hladiny homocysteinu u těchto vybraných onemocnění [16-24]. Dále byly publikovány přehledné články o vztahu homocysteinu k vybraným nemocem, rizikových faktorech pro vznik mírné hyperhomocysteinemie i možnostmi jejího ovlivnění [25-27].

V žádné studii publikované do doby zadání tématu dizertační práce, tj. do roku 1998, nebylo děláno molekulárně genetické vyšetření genů pro enzymy zapojené v metabolismu homocysteinu u českých pacientů a zdravých kontrol, ačkoli u některých byl diskutován jejich možný vliv. Zároveň nebylo známo rozložení hladin aminothiolů u pacientů s aterosklerosou a zdravých kontrol v české populaci, účinnost vitaminoterapie při modulaci mírné hyperhomocysteinemie; nebyl vypracován protokol pro methioninový zátěžový test. Bylo velmi málo informací o prevalenci polymorfismů v jednotlivých genech důležitých pro metabolismus homocysteinu a důležitosti vitamínů pro tyto reakce. U gravidních žen byly popsány pouze změny v hladině homocysteinu během gravidity, ale o dynamice ostatních aminothiolů informace chyběly. Výsledky studií o genetických faktorech spolupůsobících při vzniku defektů neurální trubice či rozštěpů páteře, kde bývá také nalézána zvýšená hladina homocysteinu, byly rozporuplné.

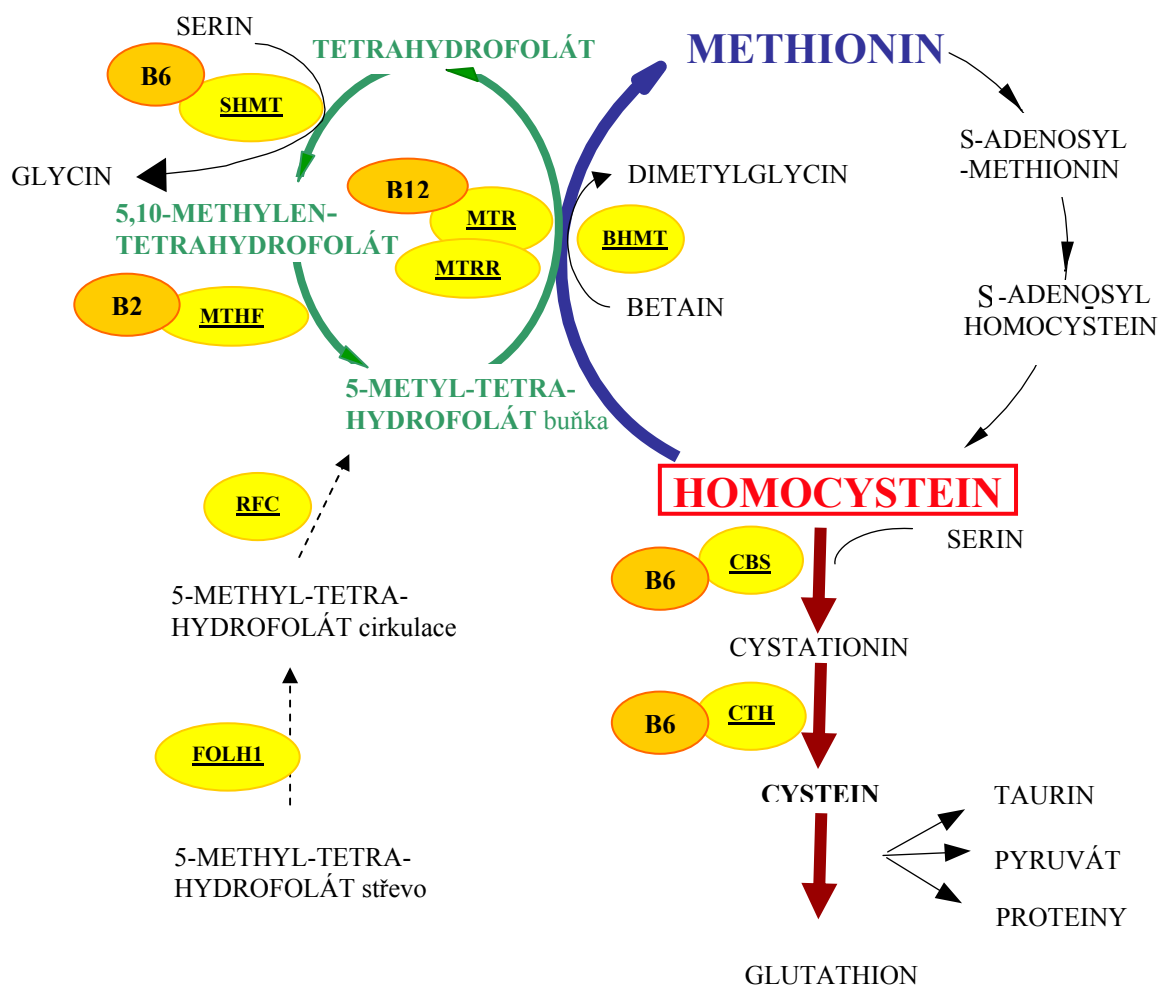
Vědecké poznatky o vlivu homocysteinu se od té doby výrazně posunuly. Nyní je většinou přijímán názor o vztahu zvýšené hladiny homocysteinu a aterosklerosy, jeho spolupůsobení při rozvoji preeklampsie. V etiologii rozštěpových vad je předpokládána geneticky podmíněná porucha folátového metabolismu, jejímž důkazem je účinná prevence těchto vad zvýšeným příjmem folátů. Většina studií je nyní zaměřena na molekulární podstatu působení homocysteinu. Obecně je uznáván vliv genotypu na rozvoj těchto komplexních nemocí, stejně tak jako možnost ovlivnění některých geneticky daných rizikových predispozicí ovlivněním ostatních rizikových a protektivních faktorů.

1.2 METABOLISMUS HOMOCYSTEINU

Homocystein je sirná aminokyselina vznikající při katabolismu methioninu v tzv. methioninovém cyklu [1]. Methioninový cyklus je ubikviterní biochemická reakce, která probíhá ve všech buňkách organismu (obr. 1). Za nejvýznamnější látku celého methioninového cyklu je považován S-adenosylmethionin (AdoMet). Tato látka vzniká v první polovině cyklu při přeměně methioninu na homocystein. AdoMet je zdrojem methylové skupiny v celé řadě transmethylačních reakcí (methylace DNA, RNA, syntéza proteinů, lipidů). S-adenosylmethionin je dále přeměněn demethylací na S-adenosylhomocystein (AdoHcy), následnou hydrolýzou AdoHcy vzniká homocystein. Takto vzniklý homocystein se ocitá na křižovatce dvou metabolických cest - buď bude remetylován zpět na methionin, nebo bude přeměněn na cystathionin a dále na cystein, taurin a anorganický sulfát v transsulfurační cestě.

Tyto dvě metabolické cesty se využívají při zpracování homocysteinu tak, aby koncentrace S-adenosylmethioninu jako důležitého donoru methylu byla udržována ve fyziologickém rozmezí [1]. Za běžných podmínek je látkové množství homocysteinu procházejícího transsulfurační a remetylační cestou zhruba stejné. Při zvýšené hladině homocysteinu (např. po požití potravy) je odbourávání homocysteinu zvýšené, a naopak – při snížení koncentrace homocysteinu dochází k intenzivnější remethylaci homocysteinu na methionin v druhé cestě. Remethylace homocysteinu probíhá ve všech tkáních, ale transsulfurační reakce homocysteinu je výhradně v pankreatu, játrech, ledvinách a CNS.

Obr.1 Metabolismus methioninu, homocysteinu a folátů



Obrázek 1: Schéma metabolismu homocysteinu. Žluté oválky představují enzymy a oranžové oválky jejich kofaktory. BHMT, betain-homocysteinmethyltransferasa; CBS, cystathionin- β -synthasa; CTH, cystathionin- γ -lyasa; FOLH1, foláthydrolasa; *MTHFR*, 5,10-methylentetrahydrofolátreduktasa; MTR, methioninsynthasa; MTRR, methioninsynthasa-reduktasa; RFC, redukovaný folátový přenašeč; SHMT, serin-hydroxymethyltransferasa; B6, pyridoxal 5'-fosfát; B12, methylkobalamin; B2, riboflavin

Remetylce

Při remetylaci se homocystein mění zpět na methionin, čímž je methioninový cyklus uzavřen. Remetylce je komplexní děj, který katalyzují dva enzymy: methionin syntasa a betain methyltransferasa.

Při tzv. „klasické“ remetylační cestě je donorem methylové skupiny 5-methyltetrahydrofolát. Tato reakce je propojená s metabolismem folátů (obr. 1, levá část). Pro dostatečnou aktivitu reakce je potřebná dostatečná dostupnost kofaktorů, kterými jsou v této komplexní enzymatické reakci kyselina listová jako prekursor tetrahydrofolátu, vitamin B₂ jako kofaktor 5,10-methyltetrahydrofolát reduktasy, vitamin B₆ (ve formě pyridoxal 5'-fosfátu) jako kofaktor serin hydroxymethyltransferasy (katalyzuje přeměnu THF na 5,10-methyltetrahydrofolát) a methylkobalamin jako kofaktor methioninsyntasy [1]. O vztahu výše uvedených vitamínů k methioninovému cyklu bude pojednáno v samostatné kapitole.

Druhá cesta je betain: homocystein methyltransferasová reakce. Tato reakce využívá jako donor methylové skupiny betain a je omezena pouze na hepatocyty [1].

Transsulfurace

Transsulfurace je jedinou cestou katabolizmu sirných aminokyselin na jednodušší sloučeniny, které plní důležité fyziologické funkce anebo jsou z organismu vyloučeny.

Transsulfurace je dvoufázová reakce. Prvním krokem transsulfurace je kondenzace homocysteinu se serinem za vzniku cystationinu. Druhým krokem je rozštěpení cystationinu na cystein a α -keto butyrát. První krok je katalyzovaný cystationin β -syntasou (CBS), druhý krok cystationin γ -lyasou (CTH). Kofaktorem pro oba enzymy je pyridoxal 5'-fosfát [1].

Při transsulfurační reakci vzniká cystein a díky tomuto možnému vzniku v transsulfurační cestě není cystein na rozdíl od methioninu esenciální aminokyselinou. U novorozenců je však aktivita cystationin γ -lyasy nedostatečná, proto je cystein pro novorozence esenciální aminokyselinou [1, 28]

Cystein se téměř ze tří čtvrtin metabolizuje na glutathion, který se velmi významně podílí na udržování intracelulárního redox potenciálu a na detoxikačních reakcích. Většina zbývajícího cysteinu se metabolizuje na cysteinsulfát, ze kterého vzniká převážně sulfát a pyruvát, a v menší míře na taurin, který vykazuje rovněž antioxidační i detoxikační vlastnosti a je důležitý pro vznik a přenos nervových vzruchů – v souladu s tím je koncentrace taurinu v mozku a myokardu vysoká. Sulfát je potřebný pro řadu biologicky důležitých pochodů, jako je detoxikace (konjugací snižuje toxicitu xenobiotik, zvyšuje jejich rozpustnost a vylučování), biosyntéza steroidů a posttranslační úpravy (např. sulfatace glykoproteinů) [29].

Hladina homocysteinu v krvi

Část Hcy vznikajícího v buňkách je exportována do extracelulárního prostoru, proto můžeme využít měření koncentrace Hcy v plazmě k posouzení jeho metabolismu. Homocystein se v krvi vyskytuje v několika formách [30]. Největší část, asi 70% celkového homocysteinu v plazmě, připadá na homocystein vázaný disulfidickými můstky na cysteinové zbytky plazmatického albuminu [31, 32]. Přibližně 10 – 30% celkového homocysteinu v plazmě připadá na oxidovanou formu homocysteinu, tj. homocystin a smíšené disulfidy homocystein-cystein, homocystein-glutathion a homocystein-cysteinylglycin. Volný redukovaný homocystein představuje nejvzácnější formu – méně než 1% celkového homocysteinu v plazmě. Termínu homocystein, pokud není blíže specifikován, se užívá pro celkový homocystein (tj. všechny formy homocysteinu dohromady).

Pro stanovení koncentrace homocysteinu se používá plazma odebraná nalačno nebo se využívá methioninový zátěžový test. Tento test je založen na stanovení hladin metabolitů methioninového cyklu před a po zátěži organismu methioninem. K zátěži se obvykle používá dávka odpovídající několikadennímu příjmu methioninu v potravě (100mg/kg), je však aplikovaná jednorázově po dvanáctihodinovém nočním lačnění. Krev na stanovení homocysteinu (a případně dalších aminothiólů) se odebírá nalačno, 4 – 6 hodin po methioninové zátěži. Methioninový zátěžový test se však rutinně nepoužívá, využívá se především ve studiích věnujících se podrobněji metabolismu homocysteinu v epidemiologických studiích. Fyziologicky se hladina lačného plazmatického Hcy u dospělého jedince pohybuje kolem 7 -15 $\mu\text{mol/l}$. Hyperhomocysteinemie pak byla Kangem [33] rozdělena na mírnou (15 – 30 $\mu\text{mol/l}$), středně těžkou (31 – 100 $\mu\text{mol/l}$) a těžkou (nad 100 $\mu\text{mol/l}$).

Samotná koncentrace homocysteinu v plazmě je určována mnoha faktory. Mezi ty, které nemůžeme ovlivnit, patří genetická výbava jedince, kdy varianty v genech kódujících enzymy v metabolismu homocysteinu a vitamínů ovlivňují celkový obrat v methioninovém cyklu [34, 35]; jednotlivé geny a jejich polymorfismy budou probrány v samostatné kapitole. Hladina homocysteinu se zvyšuje s věkem [36], je ovlivněna pohlavím - u mužů je vyšší než u žen [1, 36], dále je ovlivněna hormonálně, kdy dochází jednak k vzestupu plazmatické koncentrace u žen po menopauze [1] a naopak k poklesu hladin v průběhu fyziologického těhotenství [36]. K ovlivnitelným faktorům patří životní styl, výživa, přidružená celková onemocnění jedince. Koncentrace homocysteinu se zvyšuje s konzumací kávy [37] a alkoholu [38]. Stravovací návyky pak ovlivňují zásobení organismu některými vitamíny důležité

v metabolismu homocysteinu [5, 37, 39]. Hyperhomocysteinemie je dále způsobována dalšími zevními vlivy jako je renální insuficience [40] nebo užíváním některých léků jako jsou např. antiepileptika či methotrexát [41].

1.3 VITAMÍNY DŮLEŽITÉ PRO METHIONINOVÝ CYKLUS

V metabolismu homocysteinu jsou důležité některé vitamíny skupiny B, které slouží jako kofaktory enzymům v metabolismu homocysteinu. Jsou to: pyridoxalfosfát (vitamín B6) při transsulfuraci a v metabolismu folátů, methylkobalamin (vitamín B12) a foláty při remethylaci a riboflavin (vitamín B2) v metabolismu folátů.

Vitamín B6

Je to termolabilní bezbarvá látka, rozpustná ve vodě, citlivá na alkalické prostředí a k UV paprskům. Byl objeven v roce 1934 Paulem Györgyem. Vitamín B6 přijímaný v potravě tvoří pyridoxinová triáda - pyridoxal, pyridoxin a pyridoxamin. Tyto sloučeniny se vstřebávají v tenkém střevě prostou difuzí. Nejvíce reaktivní forma, pyridoxal 5'-fosfát (PLP), vzniká fosforylací pyridoxalu. Pyridoxal fosfát je součástí enzymů, které se podílejí na dekarboxilaci a transaminaci aminokyselin, jako součást enzymu fosforylasy se účastní odbourávání glykogenu z jater, jakmile potřebují svaly energii. Účastní se biosyntézy koenzymu A, a tím i řady metabolických reakcí, jako je glykolýza, tvorba porfyrinů s inkorporací železa do hemu. V metabolismu homocysteinu je PLP kofaktorem cystathionin- β -synthasy a cystathionin- γ -lyasy. Dále je kofaktorem serin-hydroxymethyltransferasy v metabolismu jednouhlíkatých sloučenin. Snížená hladina pyridoxal 5'-fosfátu byla popsána v souvislosti s hyperhomocysteinemií [42]. Žádný významný vliv podávání vitamínu B6 na koncentraci homocysteinu u zdravých jedinců však nebyl prokázán [43, 44].

Důležité zdroje tohoto vitamínu jsou maso, obilí, ryby, mléko a luštěniny. Obecná rizika nedostatku: skutečný nedostatek vitamínu B6 je v naší části světa vzácný, objevuje se pouze u starších osob. Projevuje se únavou, podrážděností, depresí, může vést k vyrážkám, zánětům sliznic úst a jazyka [45].

Vitamín B12

Chemicky se jedná o derivát korinu, je rozpustný ve vodě, obsahuje kobalt. Může být dlouhou dobu zahříván při 100°C, zejména v kyselém prostředí, v zásaditém se ničí rychleji. Rozeznáváme dvě formy - cyanokobalamin a hydroxykobalamin (ten je účinnější). Známý jsou dvě aktivní formy, na které se musí kobalaminy nacházející se v potravě přeměnit, a to deoxyadenosylkobalamin a methylkobalamin. Tento vitamín byl objeven v roce 1926 Dr. Georgem R. Minotem a Dr. Wiliamem P. Murphym.

Vitamín B12 je velká molekula, která vyžaduje vlastní transportní mechanismy. Resorpce ze střeva je zajišťována aktivním transportem a vyžaduje vytvoření komplexu se žaludečním faktorem (gastric intrinsic factor). Přenos v plazmě je umožněn pomocí tří kobalaminových přenašečů: transkobalamin I má funkci krátkodobé zásoby kobalaminů v plazmě, transkobalamin II slouží k distribuci kobalaminů k aktivně se dělícím buňkám a transkobalamin III přenáší kobalaminy a jejich deriváty do jater, kde se buď skladují, nebo se žlučí vylučují. Náš organismus je však schopen velmi dobře regenerovat vitamín B12, a proto jej ve stravě potřebujeme jen velmi malé množství. Tlusté střevo obsahuje také bakterie, které jsou schopny vitamín tvořit [45]. Zdrojem vitamínu jsou zejména játra a jiné živočišné potraviny.

Aktivní formou vitamínu B12 je methylkobalamin, který v metabolismu homocysteinu funguje jako kofaktor methioninsyntasy [1].

Etiopatogeneticky může mít nedostatečná dostupnost metylkobalaminu charakter vrozeného nebo získaného onemocnění, mezi jehož projevy patří neuropatie/myelopatie a megaloblastická anémie. V diferenciální diagnostice vrozených poruch kobalaminového metabolismu je nutno vyloučit poruchy příjmu, absorpce a transportu kobalaminu: nedostatečný příjem vitamínu B₁₂ (při přísně vegetariánské výživě), deficit vnitřního faktoru pro absorpci (při chronické gastritidě), poruchu absorpce kobalaminu enterocyty (resekce rozsáhlého úseku terminálního ilea), poruchu proteinů, které vážou cirkulující kobalamin (deficit transkobalaminu I nebo transkobalaminu II).

Podávání vitamínu B12 nemá v běžné populaci takový účinek na snižování hladiny homocysteinu jako podávání folátů, ale při souběžné suplementaci zesiluje účinek folátů [46] [47].

Foláty – kyselina listová

Jde o látku ze skupiny B-vitaminů, která má výrazné embryoprotektivní vlastnosti [48]. Folát je termín užívaný pro deriváty sloučenin obsahujících pterin navázaný na p-aminobenzoovou kyselinu, která dále váže glutamát. Tento vitamín je ve vodě rozpustný, poměrně termolabilní. Důležité je, že prochází snadno placentou. Kyselina listová je obsažena především v listové zelenině (špenát, brokolice, růžičková kapusta). Je možné říci, že ani při vysokém příjmu není tento vitamín toxický a toto nadbytečné množství se snadno vylučuje močí. Kyselina listová je velice důležitá u rychle se dělících buněk (sliznice GIT, kostní dřev, vyvíjející se embryo), protože se podílí na syntéze DNA (syntéza nukleotidů) a konverzi některých AMK. Někdy se kyselina listová označuje jako vit. B9 [45]. Nejvýznamnějším

folátem v lidském organismu je methyltetrahydrofolát (5-MTHF), který je i donorem methylu při remethylaci homocysteinu na methionin [49].

Foláty se v přírodě vyskytují ve formě polyglutamátových derivátů, které v žaludku hydrolyzuje glutamátcarboxypeptidasa (nově nazývaná foláthydrolasa) na monoglutamyl foláty. Ty se vstřebávají aktivním transportem s využitím redukováného folátového přenašeče. Redukovaný folátový přenašeč se podílí i na transportu folátů z oběhu do buněk. Zatímco hlavní transportní formou folátů jsou monoglutamátové deriváty (hlavně methyltetrahydrofolát), uvnitř buňky slouží jako zásoba folátů polyglutamátové deriváty. Polyglutamátové deriváty vznikají z monoglutamátových pomocí folylpolyglutamátsyntetasy [50, 51].

Methyltetrahydrofolát je v organismu opětovně syntetizován ve folátovém cyklu. Z 5-MTHF vzniká jako produkt methylační reakce tetrahydrofolát (THF). THF je dále metabolizován za účasti serin-hydroxymethyltransferasy, a při této reakci vzniká 5,10-methyltetrahydrofolát, ze kterého po redukcí katalyzované 5,10-methyltetrahydrofolátreduktasou opětovně vzniká methyltetrahydrofolát. Metabolismus folátů je znázorněn zeleně na obrázku č. 1, levá část, společně s metabolismem homocysteinu [50].

Při porušení propojení folátového a methionového cyklu (porucha methionin syntasy v remethylační cestě homocysteinu) dochází k sekundárnímu nedostatku tetrahydrofolátu (THF) a přebytku 5-MTHF [1, 31, 52] a to ze dvou důvodů: ad a) 5,10-methyltetrahydrofolát reduktasová reakce je pouze jednosměrná, tj. vzniklý 5-MTHF se nemůže metabolizovat zpět na 5,10-methyltetrahydrofolát, ad b) nejdůležitějším příjemcem methylové skupiny obsažené v 5-MTHF je právě remethylace homocysteinu na methionin cestou methionin syntasy, proto její deficit z jakéhokoliv důvodu se projeví i stagnací přeměny 5-MTHF na THF. Tetrahydrofolát je nezbytný pro biosyntézu purinů a pyrimidinů, čímž lze vysvětlit rozvoj megaloblastické anémie při jeho deficitu – vážnoucí replikace DNA při nedostatečné dostupnosti příslušných nukleových bazí se nejvíce projeví u buněk s rychlým dělením, jako jsou právě elementy hematopoiesy [45].

Porucha metabolismu folátů může spočívat buď v jejich nedostupnosti (zejména při nedostatečném příjmu stravou nebo při nedostatečné absorpci folátů v trávicím traktu), anebo v deficitu enzymů folátového cyklu (nejčastěji deficit MTHFR - viz kapitola Genetické varianty v metabolismu homocysteinu a vitamínů) [51].

Jako první popsal asociaci mezi foláty a homocysteinem Kang [31], ten pozoroval u jedinců s nízkou hladinou folátů nápadně zvýšenou koncentraci homocysteinu. Nepřímá úměra mezi koncentrací folátů v séru a koncentrací homocysteinu byla popsána u zdravých osob [32, 52], pacientů s ischemickou chorobou srdce [53, 54], starých lidí [52, 55] i dětí [56]. Foláty jsou při ovlivňování koncentrace homocysteinu považovány za silnější faktor než kobalamin, s věkem se však vliv kobalaminu zesiluje [57]. Odpověď organismu na suplementaci foláty shrnuje meta-analýza [58], která ukazuje, že denní užívání 0.5-5mg folátů snižuje hladinu homocysteinu o 25%. Dále ukazuje, že přidání kobalaminu snižuje hladinu homocysteinu o dalších 7%, zatímco přidání vitamínu B6 nemá žádný další efekt. Nejvýznamnějšího snížení hladiny homocysteinu po suplementaci foláty je dosahováno u jedinců s nízkou hladinou folátů a vyšší hladinou homocysteinu.

1.4 GENETICKÉ VARIANTY V METABOLISMU HOMOCYSTEINU A VITAMÍNŮ

Genů zapojených v metabolismu homocysteinu je mnoho, stejně tak genů pro metabolismus vitamínů důležitých pro správný chod reakcí. Větší pozornost však byla věnována jen několika. Ty nejdůležitější, s ohledem na zde probíranou tematiku, jsou popsány níže.

Cystathionin- β -synthasa (*CBS*)

Gen pro cystathionin- β -synthasu je lokalizován na chromosomu 21 a má 23 exonů. Sekvence celého genu pro *CBS* je známa od r 1998 [59]. Cystathionin beta-synthasa je první enzym zapojený v transsulfurační cestě homocysteinu, katalyzuje reakci, při níž z homocysteinu a serinu vzniká cystathionin.

Nejvíce studovaný polymorfismus v genu pro *CBS* je inserce 68 páru bazí na začátku exonu 8 (844ins68bp) - byl popsán v roce 1996 [60]. Tato inserce duplikuje konec intronu 7 a začátek exonu 8, čímž vznikají dvě sestřihová místa za sebou. Genetické studie však zjistily, že u jedinců s 844ins68 vznikající mRNA z alely s insercí je stejná jako mRNA z normální alely [61] a přenašeči polymorfismu 844ins68 mají normální aktivitu *CBS* [62]. Tato genetická varianta (inserce 68bp) je jediným polymorfismem v genu pro *CBS*, kterému je věnována větší pozornost v souvislosti s hyperhomocysteinemií a komplexními nemocemi. Většina studií neprokázala asociaci mezi 844ins68 variantou a hyperhomocysteinemií [63, 64] nebo atherosklerosou [64, 65].

V kódující oblasti genu pro *CBS* byly popsány dvě synonymní záměny, 699C>T v exonu 6 a 1080A>C v exonu 10. Přestože byla popsána asociace těchto variant s nižší hladinou homocysteinu po zátěži methioninem [66], další studie žádnou asociaci těchto polymorfismů s koncentrací homocysteinu nenalezly [67, 68].

5,10-methylentetrahydrofolátreduktasa (*MTHFR*)

Gen pro methylentetrahydrofolátreduktasu je lokalizován na krátkém raménku chromosomu 1 a má 11 exonů. Methylentetrahydrofolátreduktasa katalyzuje redukci 5,10-methylentetrahydrofolátu na 5-methyltetrahydrofolát, který slouží jako donor methylu při

remethylaci homocysteinu na methionin. V tomto genu je největší pozornost věnována polymorfismu 677C>T, menší pak polymorfismu 1298A>C.

Varianta 677C>T v exonu 4 byla poprvé popsána v roce 1995 Frosstem [69], zároveň byla popsána zvýšená termolabilita enzymu a asi 45% aktivita v lymfocytech TT homozygotů. Mutace vede k nahrazení alaninu valinem, čímž se naruší vazba kofaktoru a dochází ke snazší disociaci enzymových podjednotek tetrametru. Tato mutace je celkem častá, vykytuje se v homozygotní formě u 10% bělochů. Tento polymorfismus byl rozsáhle studován při zkoumání souvislostí mezi hyperhomocysteinemií a rizikem aterosklerozy, hyperhomocysteinemií a vznikem defektů neurální trubice [70]. Asociace mezi 677C>T variantou, zvýšenou hladinou homocysteinu rizikem aterosklerozy byla opakovaně prokázána [69, 71-73] a je výraznější u jedinců s nízkými hladinami folátů. Naopak zvýšené riziko cévních onemocnění bylo prokázáno jen v některých studiích [71, 72]. Ani dvě dosud provedené meta-analýzy [74, 75] nedaly jednoznačnou odpověď, přestože tyto studie reanalyzovaly poměrně velké soubory kontrol a pacientů (~10.000 jedinců v každé meta-analýze).

Druhý polymorfismus, 1298A>C v exonu 7, byl poprvé popsán v roce 1998 [76, 77]. Homozygoti pro tuto variantu mají nižší aktivitu enzymu v lymfocytech, kdy dochází k snížení asi na 65% aktivity normálního proteinu [77] [78]. Naopak termolabilita variantního proteinu prokázána nebyla [76]. Pro tuto variantu 1298A>C nebyla žádná asociace s koncentrací homocysteinu zjištěna [77, 79] a lze tedy předpokládat, že je funkčně neutrální.

Methioninsynthasa (*MTR*)

Gen pro methioninsynthasu leží na dlouhém raménku chromosomu 1 a má 33 exonů, poprvé byl popsán roku 1996 [80]. Methioninsynthasa katalyzuje remethylaci homocysteinu na methionin. Pro tuto reakci je nezbytný methyltetrahydrofolát jako donor methylové skupiny; zde dochází k propojení metabolismu homocysteinu s metabolismem folátů - viz obrázek. Jediným studovaným polymorfismem je 2756A>G v exonu 26. Později byl studován v souvislosti s hyperhomocysteinemií u pacientů s rozštěpem neurální trubice a cévním onemocněním [70], kdy nebyla prokázána asociace ani s koncentrací homocysteinu, ani s některým z uvedených onemocnění. Předpokládá se proto, že se jedná o polymorfismus s neutrálním efektem.

Methioninsyntasa-reduktasa (*MTRR*)

Gen pro reduktasu methioninsynthasy leží na krátkém raménku chromosomu 5 a má 14 exonů, byl popsán v roce 1999 [9]. Methioninsyntasa-reduktasa je nezbytná pro obnovu oxidované methionin synthasy - k této oxidaci dochází po několika cyklech v oblasti kobaltového kationu *MTR*. Jediným studovaným polymorfismem je 66A>G v exonu 2. Tato varianta byla spojována se zvýšeným rizikem rozštěpu páteře [81, 82], pozdější studie to však nepotvrdila [83]. Tato gentická varianta byla v jedné studii asociovaná se zvýšeným rizikem ischemické choroby srdeční [84]. Rozdíly v koncentracích homocysteinu pro jednotlivé genotypy nebyly významné [84].

Foláthydrolasa (*FOLH*)

Gen pro foláthydrolasu (dříve nazývaná glutamátcarboxypeptidasa II) leží na chromozomu 11 a má 19 exonů. Foláthydrolasa katalyzuje hydrolytické štěpení polyglutamátových derivátů folátů na monoglutamyl foláty, které jsou transportní formou folátů. Jediným polymorfismem objevujícím se v literatuře je 1561C>T, který je lokalizován v údajné katalytické doméně proteinu [85]. Heterozygoti pro tuto variantu vykazovali významně nižší koncentraci folátů v séru a vyšší koncentraci homocysteinu oproti normálním homozygotům [85]. Další studie však tento nálezn nepotvrdily a naopak prokázaly asociaci této varianty s vyšší hladinou folátů a nezměněnou koncentrací homocysteinu [86, 87] nebo nalézaly pouze nevýznamné asociace [88].

Redukovaný folátový přenašeč (*RFC*)

Gen pro *RFC* byl lokalizován na chromozomu 21. Tvoří jej 5 exonů, podrobněji byl popsán r. 1995 [89]. Redukovaný folátový přenašeč slouží jako transportér monoglutamyl folátů přes cytoplazmatickou membránu. Jediný publikovaný polymorfismus 80G>A je pravděpodobně neutrální, protože dosud nebyla žádná asociace se změnou koncentrace homocysteinu nebo folátů prokázána [90, 91]. Byl studován ve vztahu ke vzniku defektů neurální trubice, přímý vztah prokázán nebyl, bylo však zjištěno zvýšené riziko výskytu DNT i rozštěpů obličeje u osob s mutantní alelou, pakliže matky těchto jedinců neměly dostatečný příjem folátů v časném stadiu gravidity [92, 93].

1.5 KLINICKÉ STAVY SPOJENÉ S HYPERHOMOCYSTEINEMIÍ

V následující části jsou popsány dvě základní klinické skupiny, rozdělené podle koncentrace homocysteinu v plazmě. U těžké hyperhomocysteinemie je koncentrace Hcy měřená nalačno nad 100 $\mu\text{mol/l}$, u druhé skupiny, tzv. mírné hyperhomocysteinemie (mHcy), je koncentrace měřená nalačno nad 15-30 $\mu\text{mol/l}$. Právě problematice mírné hyperhomocysteinemie je věnována velká pozornost v souvislosti s patogenezí komplexních nemocí.

1.5.1 Těžká hyperhomocysteinemie

Zjištění vysoké hladiny homocysteinu obvykle svědčí o homocystinurii u daného jedince. **Homocystinurie** je dědičné autozomálně recesivní onemocnění s enzymopatií v transsulfurační nebo remethylační cestě methioninového cyklu. Homocystinurie způsobená poruchou transsulfurační cesty je nejčastěji důsledkem deficitu cystathionin- β -synthasy (CBS). Klinicky se tento defekt projevuje hlavně postižením pojivových tkání (subluxace nebo úplná luxace očních čoček, marfanoidní habitus a osteoporosa), cévního systému (okluzivní onemocnění cév jak žilního, tak tepenného řečiště) a centrálního nervového systému (mentální retardace, epilepsie, psychosy, extrapyramidové jevy). Homocystinurie je dělena na pyridoxin-responzivní (mírnější forma) a na pyridoxin-rezistentní (těžší forma). Prognóza pacientů s homocystinurií závisí na včasné diagnostice zavedení terapie (nízkoproteinová dieta, podávání vitamínu B6 a betainu) [94]. Homocystinurie z deficitu CBS je autosomálně recesivní onemocnění s incidencí 1:58.000 – 1:1.000.000 v různých populacích [95]. Incidence homocystinurie pro Českou a Slovenskou republiku je 1:287.000 [96] a je vypočtená na základě selektivního biochemického screeningu.

Homocystinurie z poruchy remethylační cesty může nastat při deficitu folátů a kobalaminu, v tomto případě dochází k funkčnímu deficitu aktivity enzymu methionin synthasy, nebo při deficitu přímo samotného enzymu methionin synthasy (MTR) či enzymu methionin synthasy reduktasy (MTRR). Při primární poruše methionin synthasy dochází k sekundárnímu nedostatku tetrahydrofolátu (THF) a přebytku 5-MTHF [50, 97], viz také kapitola Metabolismus vitamínů.

Homocystinurie z poruchy remethylace se laboratorně projevuje hyperhomocysteinemií s hypomethioninemií. Mezi klinické projevy patří těžká megaloblastická anémie a pestrá neurologická symptomatologie (opožďení

psychomotorického vývoje, epilepsie, ataxie, tonusové poruchy, atrofie CNS). Zásadním lékem v terapii této formy homocystinurie je hydroxykobalamin a betain [1].

1.5.2 Mírná hyperhomocysteinemie

Mírně zvýšená hladina homocysteinu byla popsána u mnoha komplexních nemocí jako je např. aterosklerosa [98-100], preeklampsie [11, 101, 102], nádorová onemocnění [103, 104], a také u rodičů dětí s defekty neurální trubice nebo orofaciálními rozštěpy [10, 11].

Mírná hyperhomocysteinemie (mHcy) je biochemický fenotyp, kdy je koncentrace homocysteinu v krvi nad fyziologickým rozmezím, ale nedosahuje hodnot běžně nacházených u homocystinurie. Diskuse o tom, jakou hladinu homocysteinu v plazmě lze považovat za dolní hranici mírné hyperhomocysteinemie, však doposud nebyla jednoznačně uzavřena. Za obecně nepřijatelnější lze považovat hladinu 15-16 $\mu\text{mol/l}$ nalačno. Při vyhodnocení hladiny homocysteinu v plazmě je nutno vzít do úvahy věk a pohlaví vyšetřovaného jedince a další vlivy popsané v obecné části [1, 105].

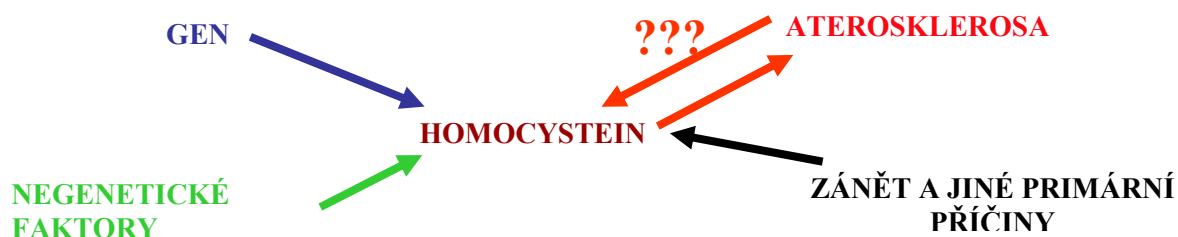
Faktory způsobující mírnou hyperhomocysteinemii lze rozdělit na exogenní a endogenní (a jejich kombinace). Mezi exogenní se řadí deficit folátů, deficit vitaminů B6 a B12 jako kofaktorů enzymů methioninového cyklu a vedlejší účinek některých látek: metotrexátu (blok folátového cyklu- obnovy THF) [106], azatioprimu (porucha funkce vitamínu B6), oxidu dusného (používaného při inhalační celkové anestézii, inhibuje methionin synthasu) [1]. Endogenní faktory zahrnují věk, genotyp jedinců (varianty v genech pro enzymy remethylační a transsulfurační cesty i cyklu folátů) a některá onemocnění: atrofickou gastritidu s následným nedostatkem vitamínu B 12 [100, 107, 108] a renální insuficienci [109]. Příkladem kombinace exogenních a endogenních faktorů jako příčiny mírné hyperhomocysteinemie je deficit folátů u jedinců s TT genotypem v 677C>T variantě genu pro MTHFR. Tato varianta vede k snížení aktivity MTHFR, a tím vede k nižší produkci 5-MTHF a zvýšené potřebě přísunu folátů ve stravě u těchto osob [73].

1.5.3 Vztah komplexních nemocí a mírné hyperhomocysteinemie

U chorob multifaktoriální povahy je těžké najít jedinou příčinu zodpovídající za vznik postižení. V patogenesi těchto poruch hrají úlohu nejspíše kombinace několika nepříznivých genetických variant s exogenními faktory. Hypotéza o vztahu mezi mírnou hyperhomocysteinemií a některými komplexními nemocemi je velmi aktuální, doposud však nebyla uzavřena diskuse o tom, jaký je vztah mírné hyperhomocysteinemie k vybraným

komplexním nemocem z pohledu kauzality. U mírné hyperhomocysteinemie v současné době existují názory, že mHcy může být kauzálním faktorem, který vede ke vzniku komplexních nemocí, jako například aterosklerosy [4, 5], ale i názory opačné, tj. že mírná hyperhomocysteinemie může být i příznakem, který pouze doprovází dané onemocnění, byť se na něm nepodílí kauzálně [13].

Obrázek č.2: Příklad předpokládaného vzájemného vztahu Hcy a aterosklerosy



Aterosklerosa je nejčastější komplexní nemocí v naší populaci. Je to proces, při kterém dochází k zánětlivé reakci endotelu a následně vzniku aterosklerotických plátů ve stěnách cév, čímž dochází k okluzi lumina arterií [110]. Aterosklerosou jsou nejčastěji postiženy cévy koronární (ischemická choroba srdeční, ICHS), cerebrovaskulární systém (mozková cévní choroba) a krevní řečiště dolních končetin (ischemická choroba dolních končetin).

Za rizikové faktory podporující vznik aterosklerosy se standardně považuje věk, mužské pohlaví, hypertenze, hypercholesterolemie a diabetes mellitus. Dále k aterogenezi přispívá nedostatek fyzické aktivity, kouření a nevhodné stravovací návyky, abdominální obezita [110]. Vznik aterosklerosy závisí ovšem i na faktorech podmíněných dědičně [111], což potvrzuje i zvýšené riziko aterosklerosy u jedinců s anamnézou předčasné aterosklerosy v rodině [110].

Je mnoho studií o vztahu aterosklerosy a mírné hyperhomocysteinemie; různé uspořádání a z toho vyplývající různé výhody a nevýhody při celkovém hodnocení. Prospektivní studie o vztahu homocysteinu a aterosklerosy mají výhodu v tom, že koncentrace homocysteinu je měřena před klinickými projevy nemoci, která tudíž nemůže sledované parametry ovlivnit. Ve většině studií s retrospektivním designem byla nalezena pozitivní asociace mezi koncentrací homocysteinu a cévním onemocněním [112-114], což ovšem může být způsobeno i publikačním tlakem proti studiím bez prokázané asociace [115]. U prospektivních studií byla významná pozitivní asociace prokázána přibližně v polovině z nich [115-117] a je mnohem slabší než u retrospektivních studií. Některé studie naopak

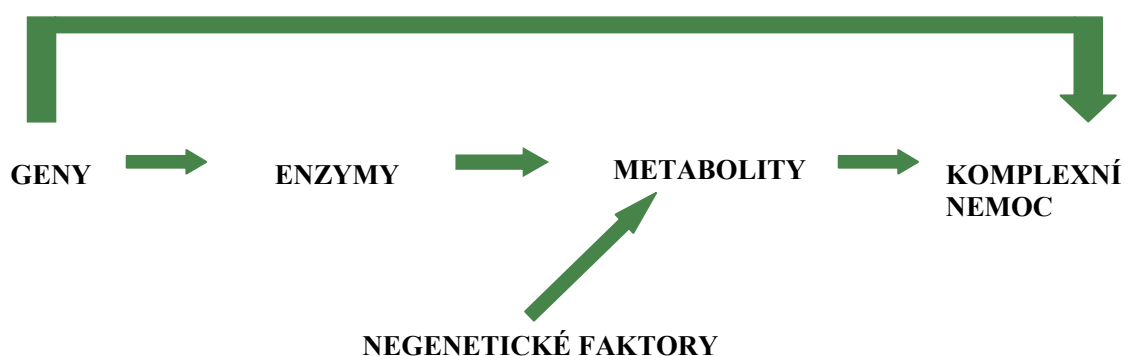
ukazují, že riziko vzniku aterosklerosy na koncentraci homocysteinu nezávisí a je asociované spíše s nižší hladinou folátů [118, 119]. Při zvýšení koncentrace homocysteinu o 5 μmol/l naznačují retrospektivní studie zvýšení rizika ICHS o cca 60%, zatímco prospektivní o cca 20-30% [120].

Nyní probíhají další studie, které jsou zaměřeny na klinický korelát, tj. přítomnost či nepřítomnost aterosklerosy u osob, kde bylo adekvátní léčbou dosaženo snížení hladiny homocysteinu na dlouhodobou mortalitu a morbiditu. Výsledky velké Hordalandské studie zahrnující více jak 7 000 jedinců ukazují, že zvýšená hladina homocysteinu zvyšuje jak kardiovaskulární morbiditu a mortalitu [121, 122], tak mortalitu na nekardiovaskulární příčiny (př. onkologická onemocnění) [121]. Recentní studie zabývající se účinností snížení hladiny homocysteinu vitaminoterapií u pacientů s prokázanou aterosklerosou ukazují, že tato léčba sníží hladinu Hcy [123, 124], ale nebylo pozorováno snížení rizika pro opakování CMP, infarktu myokardu, či výskytu nestabilní anginy pectoris [125, 126]. Naopak bylo pozorováno, že snížení hladiny Hcy v rámci primární prevence aterosklerosy zvýšeným přísunem kyseliny listové je efektivní, což dokazuje snížená mortalita na CMP v zemích, kde probíhá fortifikace foláty [127].

Možný mechanismus účinku homocysteinu na cévní stěnu byl studován u pacientů s homocystinurií, na zvířecích modelech, tkáňových kulturách i v in-vitro systémech. Za patogenetické mechanismy hyperhomocysteinemie jsou považovány např. oxidativní stres [128], poškození elastinu v cévní stěně [129], stimulace buněčné proliferace [130], interference s metabolismem oxidu dusnatého v endotelu [131] a řada dalších.

Samotné epidemiologické studie na úrovni metabolitů nejsou schopny zodpovědět otázku kauzality, proto je v poslední době více věnována pozornost genetickým a enzymatickým studiím. Tyto studie jsou schopné přispět k odlišení primárních kauzálních faktorů od sekundárních jevů způsobených samotnou chorobou. Je-li aterosklerosa do určité míry způsobována změnami v metabolismu homocysteinu a je-li metabolismus homocysteinu ovlivněn genetickými faktory, měla by existovat asociace mezi aterosklerosou a těmito genetickými faktory (obr. 3). Genetické studie zaměřené na prokázání asociace genetických variant v metabolismu homocysteinu s cévními onemocněními mohou ověřit platnost teorie o hyperhomocysteinemii jako rizikovém faktoru pro aterosklerosu.

Obrázek č. 3: Vztah genetických faktorů a komplexními nemocemi



Při studiu korelace variantního genotypu a rozvoje cévního onemocnění byla provedena rozsáhlá meta-analýza [73], z níž vyplynulo, že TT homozygocie pro polymorfismus 677C>T v genu pro MTHFR je spojená s hyperhomocysteinemií zejména při snížené hladině folátů v krvi.

Další studie byly provedeny u osob heterozygotů s deficitní CBS. Tyto studie vycházely z předpokladu, že pokud homozygoti pro deficit CBS vykazují těžkou hyperhomocysteinemií a výrazně vyšší riziko cévních nemocí, pak heterozygoti pro homocystinurii by mohli mít sklon k hyperhomocysteinemií nebo cévním nemocem. Zjistilo se však, že obligátní heterozygoti pro deficit CBS nevykazují zvýšené riziko rozvoje cévních okluzních nemocí [132].

Další studie se zaměřily na kombinaci mírné enzymatické abnormality v obou cestách methioninového cyklu zároveň. Konkrétně se uvažovalo o TT genotypu pro *MTHFR* 677C>T přítomném zároveň s heterozygocí pro polymorfismus 844ins68 v exonu 8 genu pro CBS. Přestože přítomnost samotné heterozygocie pro 844ins68 v genu pro CBS není spojena s hyperhomocysteinemií [62], přítomnost kombinace heterozygocie pro 844ins68 s TT genotypem pro *MTHFR* 677C>T byla nalezena jako významný rizikový faktor pro žilní nebo arteriální okluzivní nemoc [133].

Můžeme shrnout, že v současnosti je mírná hyperhomocysteinemie většinou považována za rizikový faktor pro aterosklerosu. Rovněž se má za to, že je rizikovým faktorem nezávislým na jiných rizikových faktorech. Zvýšenou hladinu homocysteinu lze úspěšně modulovat vitaminoterapií obsahující foláty, ale zatím není jasný dlouhodobý efekt této léčby na zvýšenou morbiditu a mortalitu u osob s mírnou hyperhomocysteinemií.

Komplikace v těhotenství patří mezi další stavy studované v souvislosti s mírnou hyperhomocysteinemií; byla pozorována u preeklampsie [11], abrupce placenty, růstové

retardace plodu [97] a dále u rodičů dětí s defekty neurální trubice nebo orofaciálními rozštěpy [9, 10].

Preeklampsie byla definována jako rozvoj hypertenze, proteinurie a otoků v období mezi 20. týdnem těhotenství a prvním týdnem po porodu. Patofyziologii preeklampsie je poslední dobou věnována velká pozornost i vzhledem k faktům, které ukazují, že ženy, které prodělaly preeklampsii/eklampsii mají v pozdějším věku vyšší výskyt kardiovaskulárních onemocnění než ostatní ženy [134-137]. Zdá se tedy, že obě nemoci mohou mít podobný patofyziologický základ a preeklampsie může být těhotenskou manifestací budoucí hypertenze a aterosklerosy. Tuto hypotézu dále podporuje výskyt některých společných rizikových faktorů pro ICHS i preeklampsii (zvýšená koncentrace LDL, dyslipidémie, BMI) [138-140].

Během fyziologického těhotenství dochází k poklesu plazmatické koncentrace Hcy [101, 141]. Tento pokles je zřejmě způsoben hemodilucí, vyšší utilizací methioninu a homocysteinu rostoucím plodem [1]. V roce 1997 ve studii Cajkovic et al byla poprvé popsána zvýšená hladina homocysteinu u žen s preeklampsií oproti netěhotným ženám [142] a jiné studie tyto nálezy potvrdily [143, 144]. Při hledání příčin tohoto jevu bylo nejvíce pozornosti věnováno polymorfismu 677C>T v *MTHFR* genu, kdy bylo zjištěno, že ženy TT homozygotky pro tuto variantu měly významně častěji preeklampsii [145]. Další studie však tuto hypotézu vyvrátila [146].

Studie zaměřené na změny hladin aminothiolů v patofyziologii preeklampsie ukázaly, že u žen s preeklampsií nedochází k poklesu plazmatického cysteinu a jeho koncentrace jsou velmi podobné koncentracím u netěhotných žen [147].

Defekty neurální trubice (DNT) jsou závažnou komplikací těhotenství, někdy vedoucí k předčasnému ukončení gravidity. Tento defekt vzniká poruchou uzávěru neurální ploténky mezi 21 - 28 dnem [7]. Příčiny vzniku tohoto defektu jsou multifaktoriální a zahrnují jak vlivy genetické, tak vlivy negenetické (hypertermie, deficit folátů, některé léky, dieta a další) [7, 148]. Biochemické studie zaměřené na objasnění příčin DNT prokázaly, že matky těchto postižených jedinců mají významně nižší hladinu folátů a vyšší hladiny homocysteinu než ženy se zdravým potomkem [8, 97, 149].

Vůbec první studie o snížené hladině folátů u matky potomka s DNT byla publikována v roce 1976 [150]. Později stejná pracovní skupina publikovala výsledky o pozitivním efektu perikoncepční vitaminoterapie obsahující foláty na snížení rizika opakování této vady [151]. Tyto výsledky byly v souladu s jinou studií, kde byly podávány foláty samotné či jako součást multivitaminů [152]. Několik dalších studií pak potvrdilo, že suplementace foláty u žen

s anamnézou výskytu DNT významně snižuje riziko opakování této vrozené vady v dalším těhotenství [8, 153-155].

Na základě výsledků studie Medical Research Council rozpracovalo Center for Disease Control and Prevention (CDC) [155] strategii prevence DNT. Jejím výsledkem bylo, že r. 1991 doporučila CDC ženám, u nichž se v předchozím těhotenství vyskytl DNT, aby užívaly foláty jako doplněk ke stravě (doporučená denní dávka je 400 μ g). V USA a v dalších zemích pak v rámci národních zdravotních programů počala značná podpora užívání folátů v těhotenství, jak osvětou, tak od r. 1998 fortifikací potravin kyselinou listovou (140 μ g na 100g mouky USA) [156]. Tato strategie se ukázala jako velmi účinná. Bylo prokázáno snížení výskytu DNT v oblastech se zvýšeným příjmem folátů [157-159].

Vzhledem k prokázanému benefitu užívání folátů a zvýšené hladině homocysteinu se na geny zapojené v metabolismu folátů zaměřily další studie [160-162]. V genetických studiích věnovaným příčinám DNT byla první a největší pozornost věnována polymorfismu 677C>T v *MTHFR* genu. První studie ukazovaly významnou asociaci DNT a homozygotní formou genu pro *MTHFR* [163]. Jiné studie však tuto asociaci neprokázaly [161, 162]. Později pak byla publikována studie, která ukazovala na zvýšené riziko NTD i u heterozygotů v tomto polymorfismu [164]. Výsledky studií jsou rozporuplné, velká meta-analýza vlivu homozygotní formy TT varianty v *MTHFR* genu matek ukazuje, že tato varianta je mírným rizikovým faktorem pro vznik DNT [10]. V jiné studii byla věnována pozornost jiné variantě v *MTHFR*, a to polymorfismu 1298A>C spolu s variantou 677C>T v témže genu [76, 165]. V obou studiích bylo zjištěno, že ženy - kombinovaní heterozygoti - mají vyšší riziko pro vznik DNT u potomka. Další analýza tento nálezn opět nepotvrdila. Poslední velká meta-analýza provedená Vollsetem a Bottem zahrnuje více než 40 studií o vlivu obou polymorfismů v *MTHFR* genu. Zde uvádějí zvýšené riziko DNT u jedinců s homozygotní formou varianty 677C>T v *MTHFR* genu (OR 1,76; CI 1,45-2,14), a lehce zvýšené riziko u homozygotů s 1298A>C variantou (OR 1,2; CI 1,04-1,61) [166].

Orofaciální rozštěpy (OR), kam patří rozštěp rtu +/- rozštěp patra. Izolovaný rozštěp patra je vývojová vada vznikající mezi 6 - 10 týdnem gravidity, rozštěp rtu již mezi 3-4 týdnem. Také u této vývojové vady byla pozorována mírná hyperhomocysteinemie, a to u matek takto postižených jedinců. Zvýšená hladina homocysteinu se tedy začala zvažovat jako rizikový faktor při rozvoji této vývojové vady [12]. Vzhledem k provázanosti metabolismu homocysteinu s folátovým cyklem a výsledům studie z roku 1982, kdy bylo publikováno, že dochází k významnému snížení rizika výskytu a opakování této rozštěpové vady perikoncepčním užíváním folátů [167], se další studie zaměřily zejména na folátový

metabolismus. Některé prokazují snížení rizika výskytu obličejového rozštěpu prekoncepčně zvýšeným příjmem kyseliny listové [11, 168-170], jiné tento pozitivní efekt neprokazují [171]. Studií o genetických variantách ve folátovém či homocysteinovém metabolismu u tohoto postižení je málo. Většina se jich věnuje polymorfismu 677C>T v *MTHFR* genu, z nich pouze jedna prokázala asociaci homozygotní formy TT varianty v tomto genu s rozštěpovou vadou obličeje, ať už rozštěpem patra samotným, či rozštěpem rtu +/- rozštěpem patra (OR 2,06; CI 1,16-3,66). Větší riziko v tomto souboru pak bylo nalezeno pro izolovaný rozštěp patra (OR 3,23; CI 1,32-7,86) [172]. Jiné studie zabývající se tímž polymorfismem asociaci neprokázaly [173, 174].

Provedená meta-analýza, zahrnující 5 studií s celkem cca 400 postižených jedinců, hodnotí celkové riziko u jedinců s TT genotypem jako téměř nezvýšené (OR 1,08; CI 0,78-1,5) [166]. Ve folátovém metabolismu byl dále studován gen pro redukováný folátový přenašeč (*RFC*) a to polymorfismus *c.80G>A*. Bylo zjištěno zvýšené riziko pro postižení obličejovým rozštěpem u osob s mutantní alelou, pakliže matky těchto jedinců neměly dostatečný příjem folátů v časném stadiu gravidity [93].

Zdá se tedy, že v etiologii obou rozštěpových vad - DNT i OR - je geneticky daná porucha ve folátovém metabolismu jedním z podílejících se faktorů při vzniku vad. Zvýšený pre a perikoncepční příjem folátů snižuje riziko vzniku těchto vad. Tento efekt je výrazný v prevenci defektů neurální trubice, zatímco v prevenci výskytu obličejových rozštěpů je význam této vitaminoterapie stále sporný.

2. CÍLE PROJEKTU

Cílem původního projektu bylo testovat, zda genetické příčiny poruch metabolismu homocysteinu hrají roli v etiopatogenezi aterosklerozy v české populaci. Původní záměr byl rozšířen o podrobnější studium genetických variant v metabolismu folátů, které úzce s touto problematikou souvisejí, jak bylo popsáno výše. Vzhledem k rozšíření poznatků o úloze homocysteinu při rozvoji komplexních nemocí byl později projekt dále rozšířen o studii zaměřenou na úlohu genetických faktorů souvisejících s metabolismem homocysteinu při rozvoji některých komplikací těhotenství, rozštěpových vad neurální trubice, orofaciálních rozštěpů a preeklampsie.

V rámci svého postgraduálního studia jsem se zúčastnila dvou výzkumných projektů - „Mírná hyperhomocysteinemie v české populaci: analýza genetických faktorů u pacientů s aterosklerosou“ a „Hyperhomocysteinemie v těhotenství: úloha genetických faktorů při vzniku defektů neurální trubice, orofaciálních rozštěpů a preeklampsie“.

Mojí úlohou v těchto projektech bylo podílet se na řešení následujících otázek:

Patofyziologie vybraných aminothiolů v rozvoji aterogeneze

❖ Metodologie vyšetření poruch metabolismu homocysteinu

- Standardizace, provedení, vyhodnocení methioninového zátěžového testu
- Stanovení referenčních rozmezí vybraných aminothiolů ve zdravé české populaci
- Zjištění, zda methioninový zátěžový test je klinicky bezpečný

❖ Etiopatogeneze aterosklerozy

- Úloha genetických variant v metabolismu homocysteinu u pacientů s ICHS

❖ Léčba mírné hyperhomocysteinemie

- Ověření biochemických účinků vitaminoterapie při modulaci mírné hyperhomocysteinemie v české populaci

Metabolismus folátů a poruchy reprodukce

❖ Fyziologické determinanty koncentrace vybraných metabolitů

- Genetické faktory ovlivňující hladiny folátů v krvi v české populaci
- Fyziologické determinanty ovlivňující hladiny aminothiolů v graviditě

❖ **Studium etiopatogeneze vybraných vývojových vad**

- Analýza rodokmenů rodin s opakovaným výskytem rozštěpové vady z celé ČR
- Vazebná analýza vybraných genů zapojených v metabolismu folátů a homocysteinu u pacientů s rozštěpovou vadou

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Studie patogeneze vybraných aminothioliů v rozvoji aterogeneze

3.1.1 Metodologie vyšetření poruch metabolismu homocysteinu

Standardizace, provedení methioninového zátěžového testu

Vypracovali jsme podrobný protokol k provedení šestihodinového zátěžového testu s L-methioninem. Na pracovišti II. interní kliniky FNKV jsme tento test provedli celkem u 887 osob (296 pacientů s prokázanou atherosklerosou a 591 zdravých kontrol).

V námi navrženém protokolu jsme sjednotili přípravu jedinců před testem i samotné provedení testu, kdy je podáváno 100mg L-methioninu na 1kg tělesné hmotnosti, rozpuštěného v 300 ml ovocného džusu (u osob nad 95 kg v 500ml džusu vzhledem k omezené rozpustnosti methioninu). Popsali jsme následné okamžité zpracování získaného materiálu pro analýzu homocysteinu (Hcy), cysteinu (Cys), glutathionu (GSH), cysteinylglycinu (CGL) před a po 6h methioninové zátěži. Navrhli jsme optimální režim pacienta v průběhu testu včetně přesně definované diety mezi odběry. Tento test je nyní snadno reprodukovatelný a může sloužit k diagnostice poruch metabolismu homocysteinu na jiných pracovištích.

Publikace viz bod 3.3.1

Stanovení referenčních rozmezí vybraných aminothioliů ve zdravé české populaci

Data o dynamice aminothioliů při standardním methioninovém zátěžovém testu byla zjištěna od velmi dobře klinicky charakterizovaných kontrol z ČR. Vyhodnocením výsledků této studie byl také potvrzen statisticky významný rozdíl v koncentraci homocysteinu mezi skupinou pacientů a kontrol (Hcy nalačno $p < 0,0001$; Hcy po methioninové zátěži $p < 0,0001$) koncentrací cysteinu (nalačno $p < 0,0001$; po methioninové zátěži $p < 0,0001$), volného glutathionu (nalačno $p < 0,0001$; po methioninové zátěži $p < 0,0001$). Potvrdili jsme, že premenopauzální ženy mají nižší hladiny homocysteinu než ženy postmenopauzální. V postmenopauzálním období mají pak ženy hladiny homocysteinu obdobné jako muži. Jako vedlejší nález bylo zjištění koncentrací vitamínů, kde bylo zjištěno, že česká populace netrpí deficitem vybraných vitamínů a není statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami pacient – kontrola. Popisné statistiky pro aminothioly a vitamíny jsou uvedeny v příloze.

Závěrečná zpráva grantu IGA MZ 26–3. Příloha- tabulky část 3.4.

Zjištění, zda methioninový zátěžový test je klinicky bezpečný

Vyhodnocením akutních nežádoucích účinků i dlouhodobého efektu po navození hyperhomocysteinemii jsme se snažili prokázat klinickou bezpečnost methioninového zátěžového testu. Ve výše popsané studii byly detailně sledovány všechny akutní nežádoucí vedlejší účinky po požití standardizované dávky methioninu. Okamžitý efekt navození hyperhomocysteinemie byl zjišťován pomocí cílených dotazů na subjektivní pocity a měřením krevního tlaku, tepu před a po zátěži methioninem. Z celkem 887 vyšetřovaných jedinců 154 z nich popisovalo neobvyklé akutní příznaky jako „lehká hlava“, tj. závrat', nespecifická bolest hlavy, pocit kocoviny (13%), ospalost (4%) a nauzeu (3%), a to ženy 2x častěji než muži. Mechanismus vzniku těchto vedlejších účinků methioninu je nejasný, tyto stavy mohly být částečně způsobeny i nízkoproteinovou snídaní, porušením biorytmu nebo velkým množstvím ovocného džusu nalačno. Abychom posoudili možné subakutní a následné nepříznivé účinky methioninového testu, zjišťovali jsme dotazníkem klinický stav vyšetřených 30 dní po testu. Ukázalo se, že u žádného účastníka studie nedošlo k subjektivnímu zhoršení zdravotního stavu a nikdo nezemřel na srdeční nebo mozkovou příhodu. Závěrem lze shrnout, že methioninový zátěžový test může být považován za bezpečnou proceduru, i když u některých osob vede k přechodným zdravotním obtížím.

Publikace viz bod 3.3.2.

Diskuse

V době počátku studie neexistoval standardní protokol k provádění methioninového zátěžového testu, nebyla známa bezpečnost takto uměle navozené nárazové hyperhomocysteinemie a nebylo známo referenční rozmezí aminothiolů pro Českou republiku. Test bývá prováděn k diagnostice poruch metabolismu homocysteinu, kde pouhé stanovení hladiny plazmatického homocysteinu nalačno nepostačuje k odhalení mírné hyperhomocysteinemie. Nejčastěji bývá indikován u osob s pozitivní osobní nebo rodinnou anamnézou kardiovaskulárního onemocnění v mladším věku, u lidí s vysokým aterogenním rizikem a normální hladinou homocysteinu nalačno; další indikace k provedení testu mohou být: hypothyreosa, renální insuficience, systémový lupus erythematodes, užívání některých léků (teofyllin, methotrexát, L-dopa) [175]. Po provedení 887 zátěžových testů jsme náš protokol navrhli jako možný standardní postup pro zjišťování změn aminothiolů po methioninové zátěži v podmínkách našeho zdravotnictví.

V souladu se zahraničními pracemi jsme zjistili statisticky významný rozdíl v koncentraci homocysteinu mezi skupinou pacientů a kontrol, jak nalačno, tak po methioninové zátěži. Stratifikovali jsme referenční rozmezí hladin aminothiolů podle pohlaví a věku.

Důkladným rozbořením vedlejších účinků hyperhomocysteinemie jsme určili 3 nejčastější akutní nežádoucí účinky a zpětným dotazováním i vyloučili pozdní negativní vliv přechodné hyperhomocysteinemie na zdravotní stav testovaných osob. Vypracovaný protokol k provádění i hodnocení methioninového zátěžového testu včetně možných komplikací je nyní dostupný pro diagnostiku poruch metabolismu homocysteinu na jiných pracovištích.

Práce o bezpečnosti MZT v takovémto rozsahu nebyla dosud publikována. Takto podrobnou analýzou na poměrně velkém souboru testovaných jedinců jsme prokázali bezpečnost námi navrženého protokolu provádění methioninového zátěžového testu.

3.1.2 Etiopatogeneze aterosklerozy

Úloha genetických variant v metabolismu homocysteinu u pacientů s ICHS

V této studii jsme sledovali, zda vybrané genetické varianty v genech metabolismu homocysteinu mají vliv na vznik a rozvoj ischemické choroby srdeční (ICHS). Studie byla prováděna v uspořádání „případ-kontrola“, kde skupinu případů tvořilo 278 pacientů s cévním onemocněním srdce a skupina kontrol sestávala z 591 jedinců odpovídajícího věku bez klinických příznaků aterosklerozy (mediány věků 56 a 50 let). V obou skupinách jsme analyzovali u každého jedince genotyp pro 5 patogenních mutací v CBS genu a pro 5 běžných polymorfismů ve čtyřech genech metabolismu homocysteinu. Z běžných polymorfismů jsme analyzovali konkrétně 677C>T a 1298A>C v *MTHFR* genu, 844ins68 v *CBS* genu, 2756A>G v *MTR* genu a 66A>G a 524C>T v *MTRR* genu.

Modelováním pomocí logistické regrese jsme zjistili, že nosičství *CBS* 844ins68 alely je významným protektivním faktorem proti ICHS (OR=0,56, 95%CI=0,35-0,90). Po analýze interakcí se ukázalo, že protektivní efekt 844ins68 varianty v *CBS* genu zůstává významný i při zahrnutí známých rizikových faktorů pro aterosklerosu (věk, pohlaví, konzumace alkoholu, hypertenze, hyperlipidemie, diabetes mellitus) do modelu a je modifikován pouze obezitou (vyjádřenou poměrem obvodu pasu a boků, WHR). Zatímco u štíhlých lidí (WHR<0,85) protektivní efekt nosičství 844ins68 varianty mizí, u obézních lidí (WHR>0,85) zůstává i nadále významný.

Pro objasnění příčiny protektivního vlivu 844ins68bp v *CBS* genu jsme udělali podrobnou analýzu metabolických profilů u těchto jedinců. Z výše uvedeného souboru 591 zdravých kontrol jsme vybrali skupinu 89 heterozygotů pro 844ins68 a k nim skupinu 89 homozygotů bez 844ins68, která se neliší věkem, pohlavím, výskytem menopauzy u žen a genotypem pro *MTHFR* 677. Tyto dvě skupiny se vzájemně nelišily ani v základních klinických parametrech (kouření, konzumace alkoholu, BMI, hypertenze, diabetes), které by mohly ovlivňovat metabolitový profil. U těchto dvou skupin jsme porovnávali nejen hladiny homocysteinu, ale i cysteinu, glutathionu, S-adenosylmethioninu (SAM) a S-adenosylhomocysteinu (SAH). Všechny aminothioly jsme vyšetřovali nalačno i po zátěži methioninem. Rozdíly v medianech mezi jednotlivými skupinami jsme porovnávali Wilcoxonovým párovým testem. Mezi koncentracemi aminothiolů nalačno byla pouze hladina S-adenosylmethioninu v krvi významně vyšší u jedinců nesoucích 844ins68 alelu ($p=0,025$). Z koncentrací aminothiolů po zátěži methioninem vyplývá odlišná funkční kapacita transsulfurace u jedinců s 844ins68. Nositelé 844ins68ins alely měli významně nižší hladiny S-adenosylhomocysteinu v krvi k homocysteinu ($p=0,004$). Tyto výsledky svědčí pro zvýšené odbourávání homocysteinu transsulfurační cestou a zlepšený methylační status u jedinců s 844ins68bp.

V naší studii se nebyla prokázána asociace mezi *MTHFR* 677C>T genotypem a ICHS. Data z této studie byla ale později zařazena do velké mezinárodní meta-analýzy, kterou prováděla holandská skupina [176]. Analyzováno bylo celkem 40 studií zabývajících se asociací *MTHFR* 677C>T genotypu a rizika ischemické choroby srdeční. Celkem byly zahrnuty výsledky od 11.162 pacientů a 12.758 kontrol. Odds ratio (OR) pro asociaci mezi *MTHFR* 677C>T genotypem a ICHS bylo stanoveno logistickou regresí a prokazuje mírné zvýšení rizika pro ICHS u 677TT homozygotů ($OR=1,16$, $95\%CI=1,05-1,28$).
Publikace viz bod 3.3.3

Diskuse

Tato část studie se zabývala asociací mezi variantami v genech metabolismu homocysteinu s aterosklerosou. Bylo analyzováno 5 patogenních mutací v *CBS* genu a 5 běžných polymorfismů ve čtyřech genech metabolismu homocysteinu. Do studie byly zahrnuty výsledky 278 pacientů s cévním onemocněním srdce a 591 zdravých kontrol odpovídajícího věku bez klinických příznaků aterosklerosy. V naší studii byla prokázána asociace se změnou rizika pro aterosklerosu pouze u jedné genetické varianty, a to u

heterozygocie pro 844ins68 variantu v genu pro CBS. U této varianty bylo pozorováno snížení rizika rozvoje ICHS.

Mechanismus působení této varianty nebyl dosud vysvětlen, ale jsou popisovány změny na metabolitové úrovni [7, 131, 147] asociované s touto variantou. I v naší studii jsme pozorovali sníženou koncentraci homocysteinu a vyšší poměr cysteinu k homocysteinu po zátěži methioninem u osob s touto genetickou variantou. Tento metabolický stav může být u těchto jedinců způsoben zvýšeným průtokem homocysteinu transsulfurační cestou. Možným vysvětlením by mohlo být preferenční využívání insercí vneseného sestřihového akceptoru [61] a tím ovlivnění efektivity posttranskripčních úprav RNA. Přestože byla ve fibroplastech 844ins68 heterozygotů původně publikována normální aktivita CBS [62], jiným vysvětlením by mohla být i zvýšená aktivita CBS [177].

Zajímavé byly výsledky u *MTHFR* 677TT genotypu. Tato varianta je velmi často sledována ve vztahu k rozvoji aterosklerozy, výsledky studií jsou však kontroverzní. Některé studie prokazují asociaci s rozvojem ICHS [71, 72] (101, 102), jiné naopak [73].

V naší studii nebyla termolabilní 677C>T varianta v *MTHFR* genu významně asociována s rozvojem aterosklerozy. Po zařazení naší studie do velké holandské meta-analýzy se pak již ukázala statisticky významným rizikovým faktorem pro ICHS, který má však poměrně malý efekt s OR 1,16 [176]. Tato diskrepance je pravděpodobně způsobena tím, že ve většině studií byly relativně malé soubory pacientů a kontrol, kdy statistická síla nebývá dostatečná pro rozpoznání relativně malého klinického efektu.

V současné době je tedy prokázána asociace *MTHFR* 677TT genotypu s vyšší hladinou homocysteinu [69, 71, 72, 113] a zároveň se zvýšeným rizikem ICHS [177, 178].

Závěrem lze tedy konstatovat, že pouze dvě genetické varianty z 10 analyzovaných polymorfismů a to 844ins68 v *CBS* genu a 677C>T v *MTHFR* genu byly v naší studii asociovány s modifikací rizika ICHS (u *MTHFR* 677 varianty až po zařazení našich dat do meta-analýzy). U těchto dvou genotypů byl pozorován rozdílný klinický efekt (zvýšené či snížené riziko cévních onemocnění) spojený s odpovídajícími změnami koncentrace homocysteinu (zvýšení či snížení), což podporuje hypotézu o kauzálním působení homocysteinu na vznik a rozvoj aterosklerozy.

3.1.3 Léčba mírné hyperhomocysteinemie

Ověření biochemických účinků vitaminoterapie při modulaci mírné hyperhomocysteinemie v české populaci

Přestože je mnoho literárních údajů o účinnosti vitaminoterapie při modulaci mírné hyperhomocysteinemie, provedli jsme vyhodnocení doporučené léčby v české populaci. Pro tyto potřeby jsme vyhodnotili 650 zátěžových testů s L-methioninem (MZT) kde bylo podáváno 100mg L-methioninu na 1kg tělesné hmotnosti. Měřili jsme koncentraci homocysteinu (Hcy) před a po šestihodinové methioninové zátěži, koncentraci vitamínů kyseliny listové v plazmě a v erythrocytech, vitamínu B6 a vitamínu B12. Po provedení MZT u 200 pacientů s aterosklerosou a 450 zdravých kontrol byla všem jedincům, u kterých byla zjištěna zvýšená hladina homocysteinu, doporučena tzv. základní vitaminoterapie tj. 400 μ g kyseliny listové, 2mg vitamínu B6, 6 μ g vitamínu B12, a to v multivitaminových preparátech obsahujících všechny uvedené vitamíny v požadovaném množství. Po třech měsících jsme provedli kontrolní zátěžový test u 80 jedinců (38 pacientů s aterosklerosou a 38 kontrol). Sledovali jsme snížení hladiny homocysteinu a úpravu koncentrací vitamínů. V obou skupinách došlo k statisticky významnému poklesu jak basální, tak pozátěžové koncentrace Hcy (pacienti $p = 0,0001$ pro snížení basálních hladin; $p = 0,0001$ pro snížení pozátěžové koncentrace Hcy; kontroly $p = 0,0001$ pro snížení basálních hladin; $p = 0,0003$ pro snížení pozátěžové koncentrace Hcy).

Při neúspěchu základní léčby jsme 20 osobám s přetrvávající mírnou HHC doporučili megadávky vitamínů (2,5mg/den kyseliny listové, 20mg/den vitamínu B6, a 1000MJ vitamínu B12 v i.m. formě po 2 týdny 1x týdně a pak 1x za 2 týdny. Po třech měsících jsme znovu zopakovali kontrolní zátěžový test. V této skupině došlo s statisticky významnému poklesu jen u skupiny kontrol, ve skupině pacientů došlo k poklesu bez statistické významnosti. U 5 žen ani při této terapii nedošlo k normalizaci hladin homocysteinu, u jedné ženy vidíme příčinu v současné léčbě antiepileptiky. Všechny tyto ženy byly předány na specializované pracoviště Prof. Hyánka, předpokládáme u nich geneticky podmíněnou poruchu zpracování homocysteinu.

Výsledky této studie ukázaly, že česká populace je k léčbě mírné hyperhomocysteinemie vnímavá srovnatelně jako ostatní sledované populace. Tato vitaminoterapie byla, stejně tak jako v jiných zemích, doporučována k léčbě mírné hyperhomocysteinemie u osob s nalezenou mírnou hyperhomocysteinémií [4].

Závěrečná zpráva grantu IGA MZ 26–3

Diskuse

Ačkoli je zvýšená hladina homocysteinu u pacientů opakovaně potvrzována v různých populacích, o kauzalitě mírné hyperhomocysteinemie při rozvoji aterosklerosy není mezi odbornou veřejností stále shoda. Za prokázané se považuje, že zvýšená hladina homocysteinu je pozorována u pacientů s předčasnou aterosklerosou [4, 109]. Opakovaně bylo také prokázano, že různé modifikace vitaminoterapie obsahující foláty významně sníží hladinu Hcy [99, 179, 180]. Z tohoto důvodu byla navržena strategie prevence rozvoje aterosklerosy zvýšeným přísunem vitamínů skupiny B a zejména foláty [175]. Následovalo několik studií, které potvrzovaly, že takto zajištěný zvýšený příjem vitamínů a zejména folátů, významně snižuje hladinu homocysteinu [123, 124]. Zvláštní pozornost byla pak věnována zemím, kde je populace celoplošně fortifikována foláty [181]. Účinnost primární prevence zvýšeným příjmem folátů lze pak sledovat porovnáním mortality sledovaného onemocnění v jinak srovnatelné populaci, kde však tato fortifikace neprobíhá. Takto bylo vypořádáno, že od r. 1998 (od kdy probíhá fortifikace potravin foláty) došlo ke statisticky významnému snížení mortality na cévní mozkovou příhodu (CMP) a to o 21% oproti populacím, kde fortifikace neprobíhá [127]. Z výše uvedeného lze shrnout, že tato primární prevence foláty je efektivní, což dokazuje snížená mortalita na CMP v zemích, kde probíhá fortifikace foláty. U těchto osob jsou nalézány významně nižší hladiny plazmatického Hcy a zároveň u nich nedochází k zvyšování Hcy s věkem oproti osobám bez suplementace foláty [127].

V loňském roce však byly publikovány prospektivní studie, které sledovaly dlouhodobý efekt léčby zvýšeným příjmem vitamínů [125, 126]. Ve dvou různých studiích bylo zahrnuto dohromady více než 9000 probandů s prokázanou aterosklerosou (pacienti po cévní mozkové příhodě či akutním infarktu myokardu). Tito jedinci byli po své ischemické atace léčeni vitaminoterapií (B6 + B12 + foláty v různých kombinacích) nebo placebem. V obou studiích nebylo pozorováno snížení rizika pro opakování CMP, infarktu myokardu, či výskytu nestabilní anginy pectoris u osob dlouhodobě zajištěných vitaminoterapií oproti kontrolní skupině vstupně obdobně postižených jedinců užívajících placebo. Dokonce byl pozorován trend vedoucí ke zvýšenému riziku výskytu nestabilní anginy pectoris u jedinců léčených vitaminoterapií.

K vysvětlení tohoto paradoxního jevu existuje více teorií. Žádná z nich zcela nevylučuje, že homocystein je jedním z kauzálních faktorů při rozvoji aterosklerosy, předpokládá se jeho přímé působení: podpora oxidativního stresu, endoteliální dysfunkce a buněčné proliferace [182-185]. Negativní dlouhodobý efekt snižování hladiny homocysteinu vitaminoterapií je pak vysvětlován vedlejšími účinky této léčby. Zvažuje se podpora buněčné

proliferace samotnými foláty s následným rozvojem aterosklerotických plátů [186]. Další možný mechanismus je v podpoře remetylační reakce v metabolismu homocysteinu a tím zvýšení S-adenosylmethioninu a s následnou výšenou koncentrací metylových skupin pro různé metylační reakce v buňkách [187]. Změněnou methyloací DNA tak může docházet k ovlivnění genetické exprese a tedy k epigenetickému působení. Může tím také dojít k methyloaci lipoproteinů a methyloací L-argininu, vzniká asymetrický dimethylarginin, který inhibuje aktivitu enzymu syntézy oxidů dusíku, a tím může docházet ke zhoršení cévního poškození [188]. Z výše uvedených důvodů autoři těchto studií [125, 126] naopak léčbu mírné hyperhomocysteinemie vitaminoterapií s foláty nedoporučují. Zároveň toto zjištění otvírá mnoho otázek: jakým mechanismem dochází k rozvoji aterosklerotických změn u pacientů s mírnou hyperhomocysteinemií, která je těchto jedinců pravidelně nacházena? A jak, je-li homocystein skutečně kauzálním faktorem, dosáhnout jeho snížení na žádané hodnoty? Je zvažována cesta navození zvýšené konverze homocysteinu v cystein v játrech a následně jeho vyloučení močí.

Zdá se tedy, že sekundární prevence vitamíny a zejména foláty při rozvoji aterosklerosy je pravděpodobně neúčinná, a objevují se zprávy, že může být naopak riziková, viz výše. Vysvětlení tohoto jevu je obtížné. Ve studiích, které poukazují na rizikovost dlouhodobé suplementace foláty, byla vitaminoterapie prováděna dávkami vyššími, než je běžně doporučováno (2,5mg a 0,8mg vs. předpokládaná účinnost fortifikace +100 µg/den) [48] vs. běžně doporučovaná dávka folátů při vitaminoterapie 400µg [189] - toto rozdílné dávkování může být příčinou kontroverzních výsledků různých studií. Dále je pak také zvažován fakt, že sekundární prevence může přicházet pozdě, a v již výrazně probíhajícím procesu aterogeneze nemá efekt. Otázka léčby mírné hyperhomocysteinemie je tedy znovu velmi diskutovaná a její zodpovězení velmi pravděpodobně přinese i nové poznatky o patogenezi aterosklerosy.

3.2 Metabolismus folátů a poruchy reprodukce

3.2.1 Fyziologické determinanty koncentrace vybraných metabolitů

Genetické faktory ovlivňující v české populaci hladiny folátů v krvi

V této studii jsme analyzovali vliv 5 genetických variant v následujících genech: *MTHFR* (677C>T a 1298A>C), *FOLH* (1561C>T), *RFC* (80G>A) a v genu pro folátový receptor (480G>C) na koncentraci folátů v krvi. U 591 zdravých jedinců jsme stanovili genotyp pro vyjmenovaných pět lokusů a vypočítali frekvenci pro českou populaci. Polymorfismus 480G>C v genu pro folátový receptor jsme vyřadili z analýzy, protože nebyl v české populaci polymorfní. Ze souboru jsme pro statistické analýzy také vyřadili jedince, kteří pravidelně užívají multivitaminové preparáty obsahující foláty. Pro posouzení vztahu mezi jednotlivými polymorfismy a hladinou folátů v krvi jsme použili: za první lineární regresi testující, zda s přibývajícím počtem variantních alel se mění hladiny folátů a za druhé Mann-Whitneyho test pro porovnání hladin folátů mezi skupinou homozygotů pro variantní alelu a skupinou heterozygotů a homozygotů pro běžnou alelu dohromady. Obě provedené statistické analýzy měly jednotný výsledek – tři varianty hladiny folátů neovlivňují a pouze 677C>T varianta v genu pro *MTHFR* byla asociovaná s nižšími hladinami folátů v plazmě. Ve skupině 510 jedinců, kteří neužívají foláty, byly mediany koncentrací folátů v plazmě následující: CC homozygoti 14,7 nmol/l, CT heterozygoti 14,0 nmol/l a TT homozygoti 12,2 nmol/l ($p = 0.04$ pro trend). Z praktického hlediska to znamená, že při suplementaci folátů, která se doporučuje jako prevence vzniku rozštěpových vad u plodu nebo pro snížení hladiny homocysteinu, může být běžná dávka pro asi 10% populace (TT homozygoty) nedostatečná. Závěrem lze shrnout, že pouze *MTHFR* 677C>T varianta je spojena s významným vlivem na plazmatickou koncentraci folátů v populaci, která není foláty celoplošně suplementovaná.

Publikace viz bod 3.3.4

Diskuse

O genetických determinantách určujících koncentrací folátů v ČR bylo velmi málo informací. V naší populaci byl podrobněji studován jen polymorfismus 677C>T v genu pro *MTHFR* [190, 191], o ostatních genetických variantách v metabolismu folátů nebyly žádné informace. Vzhledem k úzké vazbě koncentrace homocysteinu v plazmě právě s foláty, zaměřila se naše další studie na varianty v genech zapojených v metabolismu folátů. Z pěti genetických variant v genech metabolismu folátů studovaných v naší práci, ovlivňovala koncentraci folátů v krvi významně pouze varianta 677C>T v genu pro *MTHFR*. Tato

varianta byla asociovaná s nižšími koncentracemi folátů v plazmě. Toto zjištění odpovídá publikovaným studiím [69, 160, 192]. Další varianty v genech pro MTHFR (1298A>C), foláthydrolasu (1561C>T) a redukovaný folátový přenašeč (80G>A) jsou ve vztahu k folátovému statusu neutrálními variantami v české populaci. Varianta 80G>A v genu pro redukovaný folátový přenašeč byla studována se stejným výsledkem i v jiných populacích [90, 91]. Naopak polymorfismus 1561C>T ve foláthydrolase byl studován s rozporuplnými výsledky: byl asociován se snížením hladiny folátů v séru [85] i se zvýšením koncentrace folátů v plazmě [86, 87]. V další studii [88], stejně jako v naší, nebyla asociace koncentrace folátů s různými 1561C>T genotypy významná. Poslední studovaná varianta 480G>C ve folátovém receptoru nebyla v české populaci polymorfní. Závěrem lze říci, že pouze *MTHFR* 677C>T varianta významně snižuje folátový status v té části naší populace, která přijímá kyselinu listovou pouze v potravě.

Fyziologické determinanty ovlivňující hladiny aminothiолů v graviditě

O změnách hladin aminothiолů v průběhu gravidity nebylo mnoho známo. Byl popisován pokles plazmatického homocysteinu v druhé polovině nekomplikované gravidity [101]. Studie provedená v ČR profesorem Hyánkem popisovala jen změny homocysteinu, ostatní aminothioly analyzovány nebyly [21]. Existuje řada studií, které ukazují na možný vliv zvýšené hladiny homocysteinu na rozvoj preeklampsie [101, 102, 143, 144].

V našem projektu jsme na gynekologicko-porodnické klinice VFN provedli studii, v rámci které jsme odebírali biologický materiál a anamnestická data u žen ve 20. a 30. týdnu fyziologického těhotenství, přítomnost preeklampsie byla vyhodnocena po porodu. V prospektivní studii bylo vyšetřeno 150 žen ve 20. týdnu těhotenství, u 74 z nich jsme získali biologický materiál i ve 30. týdnu těhotenství. Jako kontrolní skupinu jsme použili skupinu 81 matek zdravých dětí. Získali jsme je v rámci projektu týkajícího se orofaciálních rozštěpů. Pro konečné závěrečné hodnocení a publikaci pak bylo vybráno 65 gravidních žen, kde jsme měli kompletní anamnestická data a biologický materiál z 20. i 30. týdne gravidity. U všech žen byla stanovena koncentrace vybraných celkových aminothiолů v plazmě (Hcy, CGL, GSH, Cys). V našem souboru jsme u všech čtyř aminothiолů našli významně nižší plazmatické koncentrace u těhotných žen oproti netěhotným kontrolám. Vyhodnocením dat z 20. a 30. týdne gravidity jsme mimo cysteinu nezjistili významné rozdíly v hladinách plazmatického homocysteinu ani glutathionu během fyziologického těhotenství.

V naší studii byl pozorován výrazný pokles plazmatického cysteinu u těhotných (z 190,5 $\mu\text{mol/l}$ ve 20. týdnu na 181,5 $\mu\text{mol/l}$ ve 30. týdnu; $p < 0,001$). Zároveň se dle našich

výsledků domníváme, že pokles cysteinu není způsoben zvýšenou exkrecí ledvinami u těhotných žen. Tato data ukazují, že během fyziologického těhotenství dochází k statisticky významnému poklesu hladin plasmatického cysteinu mezi 20. a 30. týdnem gravidity. viz tabulka č.1.

Publikace viz bod 3.3.5

Tabulka č. 1: porovnání plazmatických hladin aminothiolů kontrol a žen ve 20. a 30. týdnu těhotenství

Median	kontroly n=81	20.týden n=150	30.týden n=74	p*	p**
Cystein	259.1	190.5	181.5	0.0001	0.0000534
Cysteinyglycin	37.9	30.3	31.7	0.0001	0.00738
Homocystein	8.7	4.9	4.5	0.0001	0.07
Glutathion	9.7	8.2	7.85	0.0001	0.089

p*: Mann-Whitneyův test: porovnání žen ve 20 týdnu těhotenství a kontrol

p**: Wilcoxonův test: porovnání gravidních žen ve 20. a 30. týdnu těhotenství

Diskuse

Patofyziologii preeklampsie je poslední dobou věnována velká pozornost. V řadě publikovaných studií byla při manifestaci preeklampsie u těhotných prokázána zvýšená koncentrace homocysteinu [102, 143, 144].

Změny hladiny plasmatického Hcy v průběhu gravidity u českých žen popsal již profesor Hyánek [21]. V souladu s jinými pracemi byla v jeho studii zjištěna snížená hladina plasmatického homocysteinu v graviditě oproti netěhotným ženám [101]. Dále byla pozorována lehce zvýšená hladina v šestinedělí a u některých komplikací těhotenství, v této studii však nebyli sledovány změny jiných aminothiolů.

Existují studie, které ukazují, že ženy s prodělanou preeklampsií/eklampsií, mají v pozdějším věku vyšší výskyt kardiovaskulárních onemocnění než ostatní ženy [135-137], obě nemoci mohou mít podobný patofyziologický základ a preeklampsie může být těhotenskou manifestací budoucí hypertenze a aterosklerosy. Tuto hypotézu dále podporuje výskyt některých společných rizikových faktorů pro ICHS i preeklampsií, jako je zvýšená koncentrace LDL cholesterolu či triacylglycerolů [110, 138-140]. Je tedy možné, že ovlivnění těchto rizikových faktorů preeklampsie může ovlivnit průběh a tíži onemocnění podobně, jako

tomu je u aterosklerozy. V roce 1999 Jacob et al popsal zvýšenou hladinu cysteinu jako další rizikový faktor aterosklerozy [193]. Norská pracovní skupina ve výsledcích své Hordalandské homocysteinové studie zahrnující 16176 jedinců tuto asociaci potvrdila [194]. Dále pak v jiné části této studie věnované hladinám cysteinu autoři našli významnou asociaci mezi zvýšenou hladinou plazmatického cysteinu a rozvojem preeklampsie [147]. Tato závislost přetrvávala i s přihlédnutím k dalším rizikovým faktorům pro rozvoj preeklampsie (Hcy, arteriální hypertenze, BMI). Jedná se tedy o další společný rizikový faktor obou nosologických jednotek.

V literatuře bylo o změnách koncentrace cysteinu během fyziologického těhotenství k dispozici jen málo informací. Naše výsledky prokázaly významný pokles cysteinu ve fyziologickém těhotenství. Jedna ze studií ukázala, že u žen s preeklampií nedochází k poklesu plasmatického cysteinu a jeho koncentrace je velmi podobná koncentracím u netěhotných žen [143]. Lze tedy předpokládat, že znalosti o poklesu koncentrace plasmatického cysteinu během fyziologického těhotenství a absenci tohoto poklesu u žen s preeklampií mohou být použity při presymptomatickém screeningu průběhu těhotenství. Nepřítomnost poklesu cysteinu může sloužit jako časný prediktor nebezpečí rozvoje preeklampsie, což by mělo bezprostřední dopad na péči o takto ohrožené těhotenství. Zároveň tato data napovídají, že cystein je pro plod významnou kyselinou.

3.2.2 Studium etiopatogeneze vybraných vývojových vad

Analýza rodokmenů rodin s opakovaným výskytem rozštěpové vady z celé ČR

Pro analýzu genetických faktorů u defektů neurální trubice bylo nutno zajistit jejich dostatečně reprezentativní soubor, proto byla navázána spolupráce s 11 regionálními odděleními lékařské genetiky na území Čech a Moravy. Na těchto pracovištích jsem se svými spolupracovníky prostudovala 494 chorobopisů. Celkem jsem tak získala základní anamnestická data od 51 multiplexových rodin (rodin s opakovaným výskytem rozštěpové vady) - adeptů pro komplexní vyšetření; viz tabulka č. 30 v příloze.

Při důkladném vyhodnocování získaných rodokmenů jsme pozorovali nápadně častý výskyt rozštěpů obličeje (RO) v rodinách, kde byla prováděna genetická konzultace pro výskyt defektu neurální trubice (DNT). Tento nálezn byl velmi zajímavý zejména proto, že u obou těchto vývojových vad byla v literatuře popisována zvýšená hladina Hcy u matek a možná prevence podáváním folátů, jak je popsáno v obecné části. Vzhledem k této skutečnosti a faktu, že o možné vzájemné kombinaci těchto dvou rozštěpových vad v rodinách jsme nenalezli v literatuře žádné údaje, jsme se rozhodli náš nález ověřit

v epidemiologické studii. Naším cílem bylo zjistit, zda v rodinách s anamnestickým údajem DNT v blízkém příbuzenstvu existuje zvýšené riziko výskytu obličejového rozštěpu. K ověření této hypotézy jsme jako kontrolní skupinu navrhli „běžnou“ klientelu genetických poraden, kde byla genetická konzultace prováděna pro jinou než rozštěpovou problematiku. Za tímto účelem jsme prohledali 428 kontrolních chorobopisů a zjišťovali výskyt RO v příbuzenstvu.

Pro potvrzení pravdivosti údajů, že anamnesticky udávaný vyšší výskyt RO v rodinách se zátěží defektu neurální trubice není způsobený větším počtem příbuzných v postižených rodinách, jsme provedli širší analýzu obou skupin s ohledem na celkový počet jedinců v souborech. Abychom zvážili věrohodnost námi zjištěných dat, porovnali jsme námi vypočítanou incidenci obou vad s výskytem dané vady pro ČR [195, 196]. (viz tabulky č.2, 3)

Tabulka č. 2: Výskyt OR v rodinách s anamnézou DNT a v kontrolním souboru

	počet jedinců	počet postižených OR	incidence
Výskyt OR v ČR			0,00186
Rodokmeny s výskytem DNT	10269	14	0,00136
Kontrolní rodokmeny	10538	6	0,00057

Tabulka č.3: Výskyt DNT v rodinách s anamnézou DNT a v kontrolním souboru

	počet jedinců	počet postižených DNT	incidence
Výskyt DNT v ČR			0,00084
Rodokmeny s výskytem DNT	10269	22	0,00214
Kontrolní rodokmeny	10538	4	0,00038

Porovnáním těchto dvou souborů - rodin se známým výskytem DNT a kontrolních rodin - bylo zjištěno, že v rodinách s výskytem izolovaného případu DNT je výskyt obličejového rozštěpu významně vyšší (OR 2.9, CI 95% 1.1-7.5; $p = 0.027$). V souladu s jinými pracemi jsme také potvrdili fakt, že výskyt DNT v rodinách s již jedním výskytem této vady je významně vyšší než v kontrolních rodinách bez této zátěže (OR 6.9, CI 95% 2.4-20.2; $p = 0.0001$).

Připravovaná publikace viz bod 3.3.6; závěrečná zpráva grantu IGA MZ 6548-3

Analýza vybraných genů zapojených v metabolismu folátů a homocysteinu u pacientů s rozštěpovou vadou

V této části studie jsme zjišťovali, zda vybrané geny podílející se na metabolismu folátů jsou rizikovým faktorem pro rozštěpové vady obličeje a defekty neurální trubice. K řešení této otázky jsme použili vazebnou analýzu.

Do studie byly zařazeny jednak rodiny ze studie popsané výše, kdy se spoluprací souhlasilo 25 rodin. Dále pak bylo zařazeno 55 rodin s vícečetným výskytem rozštěpů obličeje, které jsme vyhledali v záznamech Kliniky plastické chirurgie FNKV a které byly ochotny ke spolupráci. Celkem se nám podařilo získat 80 multiplexových rodin a nasbírat anamnestická data od 728 jedinců, z toho 190 jedinců s některou z rozštěpových vad. Na základě vypracovaných rodokmenů jsme ve spolupráci s Dr. Terwilligerem v rodinách, v nichž se opakovaně vyskytovala rozštěpová vada, vytipovali jedince vhodné k provedení vazebné analýzy. Bylo vybráno celkem 452 jedinců, viz tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Charakteristika souboru pro vazebnou analýzu

	Zařazeno = DNA analýza	Nezařazeno	Celkem
Pacienti (n)	130 (118 OR+ 12 DNT)	60	190
Příbuzní (n)	322	216	538
Celkem	452	276	728

O některých polymorfismech v genech důležitých pro metabolismus folátů a jejich vztahu ke vzniku rozštěpových vad je již řada informací. Recentní meta-analýza zaměřená na gen *MTHFR* a jeho polymorfismus 677C>T uvádí zvýšené riziko výskytu DNT u postižených jedinců homozygotních pro tuto variantu 677C>T (OR 1,76; CI 1,45-2,14). Tatáž studie popisuje lehce zvýšené riziko NTD u homozygotů pro 1298A>C variantu téhož genu (OR 1,2; CI 1,04-1,61) [197]. U rozštěpů obličeje se pak uvádí, že u jedinců s homozygotů TT v tomto genu je riziko téměř nezvýšené (OR 1,08; CI 0,78-1,5;) [197]. Ve folátovém metabolismu byl dále studován gen pro redukovaný folátový přenašeč (*RFC*), a to polymorfismus 80G>A. Bylo zjištěno zvýšené riziko postižení obličejovým rozštěpem u jedinců s mutantní alelou, jestliže jejich matky neměly dostatečný příjem folátů v časných stádiích gravidit [92]. Výše uvedené studie měli uspořádání typu případ a kontrola. My jsme se rozhodli pro jiný typ studie, a to vazebnou analýzu.

Při samotné genetické analýze jsme pak v 9 různých genech souvisejících s remethylací homocysteinu a metabolismem folátů vyšetřili 2 - 3 markery. Celkem jsme vyšetřili 26 genetických variant v těchto genech: methylenetetrahydrofolát reduktasa (*MTHFR*), methionin syntasa (*MTR*), reduktasa methionin syntasy (*MTRR*), methylenetetrahydrofolát dehydrogenasa (*MTHFDI*), mitochondriální folátový přenašeč, (*MFTC*), redukovaný folátový přenašeč (*RFC*), folátové receptory (*FOLR1*, *FOLR2*, *FOLR3*), folát hydrolasa (*FOLH1*). Vyšetřovali jsme jak SNP (single nucleotide polymorphism), tak RFLP (polymorfismy délky restrikčních fragmentů).

Následně byla provedena vazebná analýza pro model dominantní i recesivní formy vlivu jednotlivých genů, a to spolupráci s Dr. Joe Terwilligerem z Columbia University z USA. V našem souboru nebyla prokázána vazba žádného určitého genotypu s rozštěpovými vadami RO či DNT. Vypočtená LOD skóre pro jednotlivé genetické markery jsou velmi nízká (viz tabulka č. 5), žádný z markerů nedosahuje hodnoty skóre 3, což je přijímaná hranice pro průkaz vazby daného polymorfismu s fenotypem.

Tabulka č. 5: LOD skóre pro vybrané markery

Marker	LOD dominance	LOD recesivita
FOLH 161	0.013029	0.108574
FOLH 1785	0.186747	0.108574
FOLH 1993	0.121602	0.043429
FOLR 1314	0.714414	0.673156
FOLR 4139	0.84036	0.521153
FOLR 480	0	0
MFTC 1814	0.434294	0.477724
MFTC 521	0.013029	0.021715
MTHFD 1069	0.160689	0.41258
MTHFD 1958	0.0152	0.130288
MTHFD 401	0.979334	0.82516
<i>MTHFR</i> 1298	0	0
<i>MTHFR</i> 1597	0.323549	0.347436
<i>MTHFR</i> 677	0.13246	0
MTR 2670	0.245376	0.542868
MTR 2756	0.136803	0.238862
MTR 2785	0.002171	0.065144
MTR 3576	0.060801	0.130288
MTRR 1049	0.0152	0.152003
MTRR 2505	0	0.36915
MTRR 524	1.873981	1.910896
MTRR 66	0.110745	0.260577
RFC 1446	0	0.065144
RFC 1897	0.395208	0.629727
RFC 696	0.477724	0.304006
RFC 80	0.393037	0.36915

MTHFR- methylenetetrahydrofolát reduktasa, *MTR*-methionin synthasa, *MTRR*-reduktasa methionin synthasy, *MTHFDI*- methylenetethahydrofolát dehydrogenasa, *MFTC* - mitochondriální folátový přenašeč, *RFC*- redukovaný folátový přenašeč, *FOLR1*, *FOLR2*, *FOLR3*- folátové receptory, *FOLH1*- folát hydrolasa .

Diskuse

Na etiologii komplexních nemocí, jako jsou rozštěpové vady RO a DNT, se podílí složka jak genetická, tak i enviromentální (socioekonomický status, etnikum, výživa) [148, 169]. U obou těchto vývojových vad byly publikovány vyšší hladiny homocysteinu [8, 97] [12]. Dále je prokázáno, že zvýšeným příjmem folátů dochází ke snížení rizika výskytu obou vad [8, 11, 153-155, 168-170]; u rozštěpových vad obličeje jsou však publikovány i práce, které tento efekt nepotvrzují [171]. Studie zabývající se genetickými faktory pak byly nejvíce zaměřeny na geny v metabolismu folátů. I naše studie byla vedena tímto směrem, a to ze dvou hlavních důvodů: suplementace foláty u matky je účinný způsob, jak předcházet vzniku rozštěpové vady plodu; na zvířecích modelech bylo prokázáno, že závažné poruchy metabolismu folátů vedou ke zvýšenému výskytu rozštěpových vad v potomstvu [198-200].

Naše studie zahrnovala vyšetření 2 nejčastěji diskutovaných polymorfismů v genech *MTHFR* a *RFC*, ale stanovili jsme také genotyp v dalších genech metabolismu folátů. Samotná vazebná analýza byla uskutečněna ve spolupráci se zahraničním pracovištěm Columbia University z USA. Soubor zahrnoval 450 jedinců, které jsme vybrali z 80 rodin.

Při samotném sběru dat a zajišťování rodin s opakovanými výskyty rozštěpové vady v rodině pro laboratorní část projektu, jsme našli statisticky významnou asociaci mezi výskytem defektu neurální trubice a rozštěpy obličeje. V rodinách s izolovaným výskytem DNT jsme našli třikrát častěji příbuzné s rozštěpovými vadami obličeje ve srovnání s rodinami vyšetřovanými z jiných genetických indikací než DNT. Abychom vyloučili, že výsledek není dán nepřesností údajů či nestejně velkým zkoumaným rodokmenem v obou skupinách, rozhodli jsme se porovnat naše data s incidencí vad v literatuře. Z porovnání takto získaných dat vyplynulo, že výskyt DNT i RO v kontrolním souboru je o polovinu (pro DNT) až dvě třetiny (pro RO) nižší než v literárních údajích o incidenci pro ČR. V České Republice jsou incidence vrozených vývojových vad předmětem povinných hlášení již několik desetiletí. Uvedené hodnoty incidencí odrážejí trendy posledních let a incidence získaná z rodokmenových studií je zatížena kromě jiného i přirozeným lidským zapomínáním, snahou potlačit nepříjemné vzpomínky a záměrnou neinformovaností širší rodiny o vrozené vadě v rodině. Takto získaná neúplná anamnestická data „výbavnost dat v rodinách“ - mohou ve

svém důsledku modifikovat výsledky retrospektivních studií ve srovnání s literárními údaji o výskytu těchto vad v ČR. Nepřesnost takto retrospektivně získaných anamnestických dat se však očekává [201]. Výbavnost RO je ještě mírně nižší než pro DNT. Tato diskrepance (mezi výbavností RO a DNT v rodinách) může být způsobena tím, že RO je méně závažná vada, u které je možná plastická korekce, navíc u rozštěpů patra po operaci není kosmetický defekt a příbuzní se o vadě nemusí dozvědět. V rodinách s výskytem DNT je výskyt další rozštěpové vady (DNT i RO) vyšší než v kontrolních rodokmenech, ale ani zde výskyt RO nedosahuje literárních údajů (zhruba jen tři čtvrtiny). Výskyt DNT v souboru s již jedenkrát udávaným DNT v rodině však naopak převyšuje incidenci této vady popisované v literatuře, a to asi 2,5krát. Pak tedy za předpokladu, že výbavnost byla u obou vad stejně zkreslená, je rozdíl v incidenci RO v kontrolním souboru a v DNT rodinách dán genetickou (ponejvíce polygenní) komponentou. Rodiny s DNT v anamnéze mají 3x vyšší riziko výskytu RO. Nenáhodně častější výskyt obličejového rozštěpu v rodinách s defektem neurální trubice podporuje hypotézu o možných genetických příčinách zvýšené náchylnosti ke vzniku rozštěpových vad obecně, přičemž tyto poznatky mohou mít i možné dopady na určení rizika vrozených vývojových vad při genetickém poradenství.

Molekulárně genetické vyšetření ve vybraném souboru, vyhodnocené v zahraniční spolupráci metodami vazebné analýzy neprokázala vazbu sledovaného fenotypu (DNT, RO) se žádným z 9 sledovaných genů (celkem 26 molekulárně genových markerů) v metabolismu folátů. Negativní výsledek v naší studii však nevylučuje provázanost porušeného folátového metabolismu se vznikem vývojových vad; neúspěch by mohl být způsoben omezeným počtem rodin zahrnutých do analýzy, fenotypovou klasifikací, omezenou volbou a rozsahem vyšetřovaných markerů atp. V případě jiné kombinace markerů s použitím téhož, byť malého souboru by výsledek mohl být pozitivní, jak naznačuje nejlepší z našich výsledků pro *MTRR* 524 s LOD skorem dominance 1,87 a LOD skorem recesivity 1,91. Jakkoli dosavadní studie, k nimž se naše dosud nepublikované výsledky řadí, neukázaly jednoznačně na některý z genů folátového metabolismu při objasňování etiologie obou těchto komplexních vrozených postižení, úloha genetické komponenty je důležitá a nezpochybnitelná.

3.3. Kopie publikovaných prací

- 3.3.1 A.Vítová, K.Veselá, L.Meixnerová, M.Anděl, V.Kožich. Methioninový zátěžový test; Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa 2/2001, 119-123. L.
- 3.3.2 Krupková-Meixnerová, K. Veselá, A. Vítová, B. Janošíková, M. Anděl, V. Kožich: Methionine- loading test: evaluation of adverse effects safety in an epidemiological study, Clinical Nutrition., 2002 21(2): 151-156. (IF 2,3; CSI 5)
- 3.3.3 Janošíková B., Pavlíková M., Kocmanová D., Vítová A., Veselá K., Krupková L., Kahleová R., Krijt J., Kraml P., Hyánek J., Zvárová J., Anděl M., Kožich V.: Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. Mol Genet Metab., 2003 79 (3): 167-175. (IF 2,68; SCI 8)
- 3.3.4 Veselá K., Pavlíková M., Janošíková B., Anděl M., Zvárová J., Hyánek J., Kožich V.: Genetic determinants of folate status in Central Bohemia. Physiological Research, 2005 54 (3): 295-303. (IF 1,80; SCI 3)
- 3.3.5 Víšková H., Veselá K., Janošíková B., Krijt J., Víšek JA., Calda P.: Plasma Cysteine Concentrations in Uncomplicated Pregnancies. Fetal Dian Ther., 2007 22 (4): 254-258. (IF 0,89)
- 3.3.6 Veselá K., Panczak A., Boučková M., Čutka K., Gailyová M., Gregor V., Havlovicová, M., Jelínková E., Kloubová M., Kofer J., Krofta J., Laštůvková J., Leznarová D., Pavlíková M., Peterka P., Prášilová Š., Šantavá A., Šilhánová E., Vejvalková Š, Židovská J., Kožich V.: Coincidence of oralfacial clefts and neural tube defects in Central European families: připravovaná publikace do American Journal of Medical Genetics. (IF 2,47)

3.3.1

Methioninový zátěžový test

Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa , 2001

METHIONINOVÝ ZÁTĚŽOVÝ TEST

METHIONINE-LOADING TEST

ANDREA VÍTOVÁ¹, KAMILA VESELÁ², LUCIE MEIXNEROVÁ³,
MICHAL ANDĚL², VIKTOR KOŽICH³

¹Ústav lékařské chemie a biochemie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha

²II.interní klinika FNKV a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha

³Ústav dědičných metabolických poruch 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha

SOUHRN

Více než 30 let je mírná hyperhomocysteinémie nalačno a/nebo po standardní methioninové zátěži řazena některými autory mezi nezávislé rizikové faktory aterosogeneze. Standardní methioninový test spočívá v podání methioninu – prekurzoru homocysteinu perorální cestou v dávce 100 mg na 1 kg hmotnosti vyšetřovaného. Odběr krve je proveden nalačno a mezi 4.-8. hodinou po požití podané látky. Test nevyžaduje speciální přípravu. Zatím nejsou známy významné nežádoucí účinky methioninu. Methioninový test je indikován u mladších pacientů s vysokým rizikem aterosklerózy a normálními hodnotami homocysteinu nalačno. Normální hodnoty koncentrací homocysteinu nalačno i po zátěži jsou definovány na základě rozložení koncentrací naměřených u zdravé populace, závisí na věku a pohlaví. Pokud prospektivní studie potvrdí kauzální vztah homocysteinu a aterosogeneze, pak bude vyšetření homocysteinu nalačno a po methioninové zátěži šetrným vyšetřením jednoho z nekonvenčních rizikových faktorů aterosklerózy.

Klíčová slova: methionin – homocystein – methioninový test – ateroskleróza

SUMMARY

For more than 30 years, mild to moderate hyperhomocysteinaemia either fasting or, after methionine loading have been placed by some authors to independent risks of atherosclerotic vascular disease. The methionine-loading test consists in the peroral administration of 100 mg of methionine (precursor of homocysteine) per kilogram. The plasma total homocysteine is measured before and 4-8 hours after ingestion of methionine. No significant adverse effects of the methionine administration was described yet. A normal range of fasting homocysteine and concentration after a methionine-loading test is defined by an arbitrary cut-off in the distribution of concentrations found in the normal population and depends on age and sex. It is recommended to measure homocysteine levels after a methionine-loading test in high-risk patients with normal basal homocysteine levels. If the prospective studies confirm the causality between atherosclerosis and homocysteine will be the measurement of fasting homocysteine and homocysteine after a standardised methionine-loading test an unpretentious test for determination of non-conventional vascular risk.

Key words: methionine – homocysteine – methionine-loading test – atherosclerosis

HISTORIE

Methioninový test byl původně prezentován jako diagnostický test pro detekci heterozygotů pro cystathionin- β -syntázu, tj. pacientů s poruchou transsulfurační metabolické cesty zpracování homocysteinu (Fowler et al. 1971) (viz obrázek 1). Pozdější studie však prokázaly, že tyto heterozygoti mohou mít normální koncentrace plazmatického homocysteinu nalačno i po methioninovém zátěžovém testu. (Sperandeo et al. 1996) V současné době je methioninový zátěžový test určen k diagnostice poruch metabolismu homocysteinu, kdy pouhé stanovení hladiny homocysteinu v plazmě nalačno vede k nedostatečnému diagnostikování pacientů s mírnou hyperhomocysteinémií, jež je některými autory považována za nezávislé riziko vzniku aterosklerózy. Jedna ze studií zaměřených na genetická a negenetická rizika vzniku aterosklerózy vyšetřila homocystein nalačno a po methioninové zátěži u 274 osob. U 47 vyšetřených byla diagnostikována mírná hyperhomo-

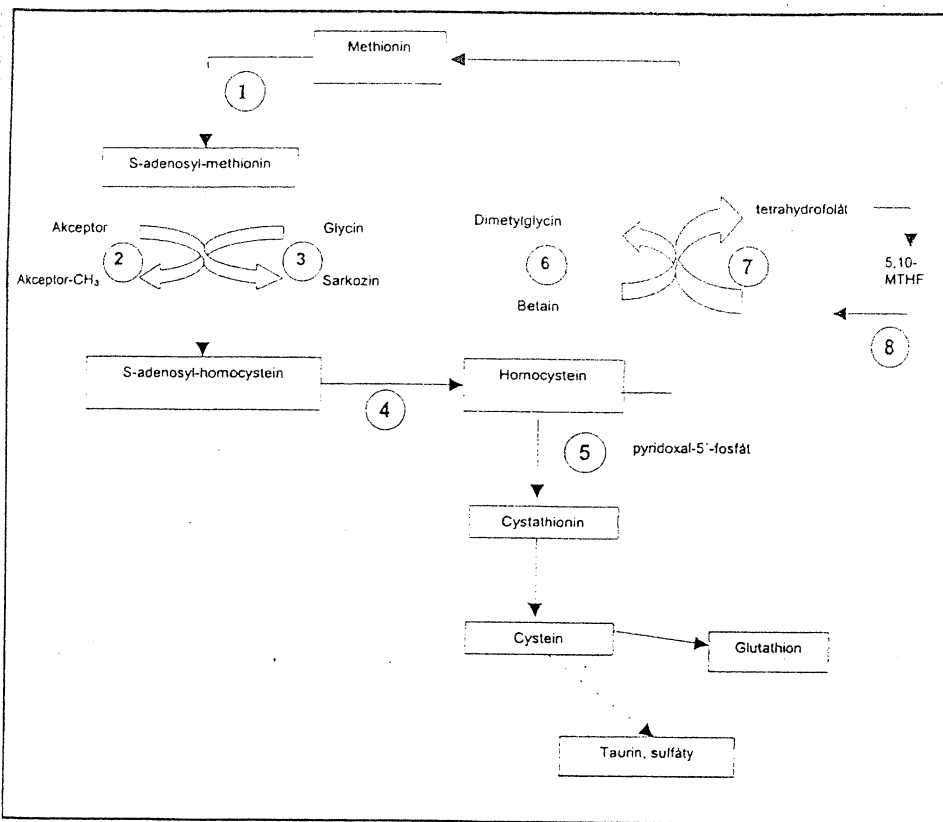
cysteinémie. Dvacet osob s diagnózou mírné hyperhomocysteinémie mělo normální hladiny homocysteinu nalačno a metabolická porucha byla identifikována teprve methioninovým testem (Bostom et al. 1995)

CHARAKTERISTIKA METHIONINU JAKO CHEMICKÉ LÁTKY

Po stránce biochemické je methionin esenciální aminokyselina obsahující síru, kterou běžně přijímáme v potravě jako složku živočišných bílkovin (viz obr. 2). Z hlediska fyzikálně-chemického je methionin bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je dobře rozpustný ve vodě. Jeho vodný roztok je kyselé povahy o pH 5,5-6,5 (Český lékopis 1999).

METABOLISMUS METHIONINU

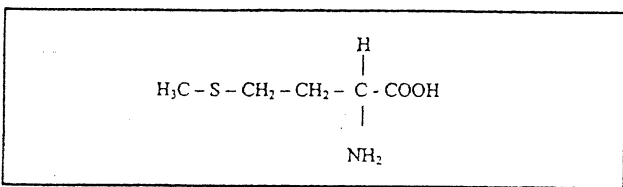
Methionin podléhá demetylací za vzniku homocysteinu. (viz obrázek 1). Vzniklý homocystein může být zpracován



Obr. 1: Metabolismus methioninu

1. methioninadenosyltransferáza
2. S-adenosylmethionin-dependentní transmetylační reakce
3. glycinmetyltransferáza
4. S-adenosylhomocysteinhydroláza
5. cystathioninbeta-syntéza (pyridoxal-5'-fosfát dependentní)
6. betain:homocysteinmetyltransferáza
7. 5-metyltetrahydrofolát:homocysteinmetyltransferáza (metylkobalamin dependentní)
8. 5,10-metyltetrahydrofolátreduktáza
5,10 MTHF - 5,10-metyltetrahydrofolát
5 MTHF - 5-metyltetrahydrofolát

Podle: Loehrer FMT, Haefeli WE, Angst CP, Browne G, Frick G, Fowler B. Effect of methionine loading on 5-methyltetrahydrofolate, S-adenosylmethionine and homocysteine in plasma of healthy humans. Clin Sci 1996, 91: 79-86



Obr. 2: Methionin

dvěma různými metabolickými cestami: ireverzibilní transsulfurací nebo reverzibilní remetylací v rámci tzv. methioninového cyklu (Finkelstein 1998). Produktem transsulfurace je cystein, jenž dává vzniknout glutathionu nebo je dále metabolizován za vzniku sulfátů vylučovaných do moči. Kofaktorem transsulfurace je pyridoxal-5'-fosfát. Při zvýšené poptávce po methioninu je homocystein remetylován účinkem 5-metyltetrahydrofolát:homocysteinmetyltransferázy (tj. methioninsyntézy) zpět na methionin. Donorem metylu je 5-metyltetrahydrofolát. Remetylace může být v játrech a ledvinách zprostředkována také enzymem betain:homocysteinmetyltransferázou, který využívá jako donor metylové skupiny betain.

Podání methioninu vede k nadbytku intermediárního metabolitu S-adenosyl-methioninu, který částečně zablo-

kuje remetylační metabolickou cestu a z nějž intracelulárně vzniká homocystein uvolňovaný do extracelulární tekutiny. Tak se přechodně zvyšuje koncentrace celkového plazmatického homocysteinu, která dosahuje maxima mezi 4.-8. hodinou po požití methioninu (Ueland et al. 1989). V tomto časovém rozmezí se blíží koncentrace plazmatického homocysteinu dvojnásobku až trojnásobku hladiny nalačno (Graham et al. 1997). K výchozím hodnotám se koncentrace homocysteinu navrácí po 24 až 48 hodinách (Ueland a Refsum 1989).

METHIONINOVÝ ZÁTĚŽOVÝ TEST

V naší studii, která se věnuje vztahu homocysteinu a aterosklerózy, jsme dosud provedli více než tisíc zátěžových testů s methioninem. Řídili jsme se níže uvedeným protokolem, který jsme vypracovali na základě literárních údajů o methioninovém testu.

1. Příprava před testem:

Podle dostupných zdrojů není speciální příprava před methioninovým testem nutná. V posledních 24 hodinách

před vyšetřením se pacient vyvaruje výrazné fyzické námahy a zvýšeného příjmu bílkovin ve stravě, tj. není vhodná účast na rodinných slavnostech, zabijačkách a podobně. Dvanáct hodin před testem spojeným s odběrem krve pacient lační, od půlnoci nepije a omezí kouření.

2. Podání methioninu: Pacientovi je podán methionin rozpuštěný v nápoji, v dávkě 100 mg látky na 1 kg tělesné hmotnosti pacienta (Zschocke a Hoffmann 1999). Většina na studii používá jako rozpouštědlo pomerančový džus, který dobře potlačuje nepříjemnou chuť podávané látky. Je nutné si však uvědomit, že i džus je zdrojem methioninu. Podle tabulek 300 ml pomerančového džusu obsahuje asi 28 mg methioninu (Acosta a Yannicelli 1997). Protože džus je používán u všech našich vyšetření, můžeme tento postup považovat za standardní. Množství nápoje, ve kterém je rozpouštěn methionin, není doporučováno jednoznačně. Je nutné zohlednit omezenou rozpustnost methioninu, která činí podle údajů výrobce 30 g/l. V naší studii jsme pro pacienty s tělesnou hmotností nižší než 95 kg rozpouštěli příslušnou dávku methioninu v 300 ml džusu. Pokud pacient vážil více než 95 kg, byl methionin s ohledem na omezenou rozpustnost rozpuštěn v 500 ml džusu.

3. Odběry vzorků krve v průběhu methioninového testu: První vzorek krve se odebírá nalačno. Druhý vzorek krve je nutné vzhledem ke kinetice podané látky odebrat s časovým odstupem 4-8 hodin (Ueland a Refsum 1989), ve většině studií je odebírána krev po 6 hodinách. Z ekonomického i časového důvodu by bylo přínosné zkrácení methioninového testu na 2 hodiny, ale výsledky takto modifikovaného testu nejsou reprodukovatelné (Bostom et al. 1995). Je obvyklé kromě homocysteinu stanovit také koncentrace vitaminů B6, B12 a kyseliny listové, které působí jako kofaktory metabolismu methioninu a homocysteinu (Zschocke a Hoffmann 1999) (viz obrázek 1).

4. Zpracování vzorků krve: Koncentrace homocysteinu v plazmě za přítomnosti krevních elementů stoupá v závislosti na teplotě. Při pokojové teplotě stoupá za 1 hodinu koncentrace homocysteinu v plazmě o 5-15 %. Vzorky krve je proto nezbytné okamžitě, tedy v praxi asi do 2 minut uložit na led. Dále by měla být krev zbavena buněčných elementů centrifugací. V naší studii jsme krev centrifugovali do 30 minut po odběru po dobu 15 minut při 2000 G. Plazmatické koncentrace homocysteinu jsou pak stabilní při pokojové teplotě po dobu několika hodin, při teplotě 0-2 °C maximálně po dobu 14 dní a při teplotě -20 °C po dobu několika let (Ueland et al. 1993). Jiní autoři doporučují dodat stabilizační roztok, například fluorid nebo 3-deaza-adenozin (Möller a Rasmussen 1995, Zschocke a Hoffmann 1999).

5. Režim pacienta v průběhu methioninového testu: V mezidobí mezi oběma odběry může pacient vykonávat mírnou fyzickou zátěž a omezit kouření.

Příjem potravin je omezen na nízkobílkovinnou svačinu, která obsahuje maximálně 30 mg methioninu. V naší ambulanci jsme podávali při methioninovém testu například tuto svačinu: 200 g nízkobílkovinného chleba Vitaprotam, 20 g rostlinného másla, 1 vaničku medu nebo marmelády a 100 g jablka nebo jiného ovoce. Svačina obsahuje asi 20 mg methioninu. Pro porovnání 100 g hovězího masa obsahuje 520 mg methioninu a 100 g pšeničného chleba obsahuje 104 mg methioninu. Potrava bohatá na bílkoviny požitá v průběhu testu by mohla zvýšit koncentrace homocysteinu o 15-20 % (Guttormsen et al. 1994).

Příjem tekutin není omezen objemem, ale pacient se musí vyvarovat mléčných nápojů i nápojů s nízkým podílem mléka, jako je bílá káva nebo cappuccino. Dále již není vhodným nápojem džus nebo koncentrované ovocné a zeleninové šťávy. Uvedené nápoje by mohly být nežádoucím zdrojem methioninu a jejich požití by vedlo ke zkreslení výsledků. Pacientům doporučujeme minerální vody bez příchuti, černou kávu a čaj, hořký nebo oslazený.

6. Indikace methioninového zátěžového testu: Americká kardiologická asociace AHA zatím nedoporučuje vyšetřovat koncentrace homocysteinu formou celoplošného screeningu. Právě probíhající prospektivní studie rozhodnou, zda současné stanovisko bude platit i nadále. Vyšetření koncentrací homocysteinu nalačno je doporučeno u těchto osob: pacienti s rizikovou rodinnou či osobní anamnézou kardiiovaskulárního onemocnění v mladším věku, pacienti s malnutricí a malabsorpcí, u kterých předpokládáme nízkou saturaci vitaminy B6, B12 a kyseliny listové, pacienti s hypotyreózou, chronickým renálním selháním, systémo-

vým lupus erytematodes, u pacientů léčených kyselinou nikotinovou, teofylinem, pryskyřicemi, metotrexátem nebo deriváty L-dopy. Provedení methioninového testu je doporučeno u pacientů s vysokým aterogenním rizikem a normální hladinou plazmatického homocysteinu nalačno (Malinow et al. 1999).

Autor ve svém doporučení přesněji nedefinoval věkovou hranici odpovídající mladšímu věku pro riziko kardiiovaskulárního onemocnění. My se domníváme, že plazmatický homocystein nalačno a po methioninové zátěži by měl být vyšetřen u mužů, u nichž došlo ke klinické manifestaci aterosklerózy před 55. rokem života, a u žen, u kterých došlo k rozvoji onemocnění před 60. rokem, zejména pokud další známé rizikové aterogenní faktory jsou v rozmezí normálních hodnot nebo pouze mírně zvýšené.

7. Načasování testu: Většina autorů neprovádí methioninový zátěžový test bezprostředně po infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhodě. Výpovědní hodnota vyšetření koncentrace homocysteinu v těsné časové souvislosti s akutní ischemií a rizikovost methioninové zátěže v tomto období zatím nejsou jednoznačně posouzeny. Je prokázáno, že u nemocných po prodělané cévní mozkové příhodě stoupá plazmatická koncentrace homocysteinu s časovým odstupem jeden a půl až dva roky od ataky (Lindgren et al. 1995). Studie samozřejmě nedokázala posoudit, jaké byly koncentrace homocysteinu před manifestací onemocnění.

8. Kontraindikace: V dostupné literatuře se nám nepodařilo nalézt absolutní kontraindikace podávání methioninu a provedení methioninového zátěžového testu.

Z informací firmy vyrábějící methionin v tabletové formě vyplývá, že methionin není vhodné podávat pacientům s metabolickou acidózou, pacientům s renální tubulární acidózou a pacientům s těžkým jaterním selháním (Dědina 1995).

9. Klinické nežádoucí účinky methioninu: Český lékopis ani četné zahraniční studie, do kterých byly zařazeny tisíce pacientů, se nezmiňují o žádných závažných nežádoucích účincích podávání methioninu. Ojedinele byly popisovány pouze nauzea a pyróza, které mohou být do jisté míry vyvolány nepříjemnou chutí methioninu a lokálním drážděním žaludeční sliznice. V naší studii jsme vyšetřili celkem 589 zdravých kontrol a 298 pacientů; asi u 15 % z osob zatížených methioninem se vyskytly tyto nežádoucí účinky: nauzea, bolest hlavy, ospalost a vertigo.

10. Subklinické účinky methioninu: Studie účinků methioninu a homocysteinu na buněčné úrovni přinesou rozhodnutí, zda je podání methioninu vsutku tak bezpečné, jak uzavírají dosavadní klinické výsledky. Z publikací, které se věnovaly studiu methioninem indukované hyperhomocysteinémie, vyplývají další možné účinky methioninu a jeho metabolitů, v první řadě homocysteinu, na lidský organismus. Methionin v dávce 50 mg/kg nevede ke zvýšení koncentrace volných endotelií, avšak dávka 100 mg/kg zvýšení vyvolává (Hladovec et al. 1999). Podání methioninu může v experimentu vyvolat endoteliální dysfunkci - poruchu endotelium-dependentní vazodilatace, která je pravděpodobně vyvolána ovlivněním metabolismu oxidů dusíku (Chao et al. 2000). Jeden týden trvající terapie vita-

minem C v dávce 1g/den (Chambers et al. 1999a) nebo jednorázově současně s methioninem podaná kyselina listová v dávce 20 mg (Usui et al. 1999) vedly k zmírnění respektive úplnému potlačení poruchy endotelium-dependentní vazodilatace. Tíže poruchy endotelium-dependentní vazodilatace byla úměrná přírůstku koncentrace homocysteinu po methioninové zátěži, koncentraci homocysteinu nalačno a věku (Lambert et al. 1997). Endotelium-non-dependentní vazodilatace není methioninovou zátěží ovlivněna (Kanani et al. 1999).

Jedna studie sledovala vliv fyziologického nárůstu plazmatické hladiny homocysteinu po příjmu živočišných bílkovin na endoteliální dysfunkci u zdravých lidí. Zdravé kontroly snědly libové kuřecí maso (1 porce představovala 550 g masa), tedy každý vyšetřený byl zatížen asi 3,2 g methioninu. Homocystein stoupl v průměru asi o 2 $\mu\text{mol/l}$. Sledovaná porucha endotelium-dependentní vazodilatace přímo závisela na přírůstku koncentrace plazmatického homocysteinu (Chambers et al. 1999b).

11. Hodnocení methioninové zátěže a normy: Koncentrace homocysteinu nalačno závisí přímo na věku a pohlaví, u žen stoupá po menopauze (Mayer et al. 1999, Ueland a Refsum 1989).

Arbitrární dělení podle Kanga považuje za normální plazmatickou koncentraci homocysteinu rozmezí 5-15 $\mu\text{mol/l}$ nalačno. U mírné hyperhomocysteinémie je koncentrace zvýšena na 15-30 $\mu\text{mol/l}$, u střední hyperhomocysteinémie se koncentrace pohybuje mezi 30-100 $\mu\text{mol/l}$. Těžká hyperhomocysteinémie je charakterizována koncentracemi vyššími než 100 $\mu\text{mol/l}$, které jsou typické pro metabolické onemocnění homocystinurii (Kang et al. 1992). Hladina homocysteinu nalačno ani po zátěži není v populaci rozdělena normálně podle Gaussovy křivky, nýbrž je sešikmena doprava. Proto je vhodnější normu vyjádřit pomocí 85-90. percentilu event. 4. kvartilu nebo 5. kvintilu rozložení hodnot získaných šetřením u normální populace.

V naší studii byly vyšetřeny koncentrace homocysteinu nalačno a po 6 hodinách methioninové zátěže u kontrolní skupiny čítající 589 zdravých lidí. Výsledky jsou zpracovány v tabulce 1 a 2. S rostoucím věkem stoupají i koncentrace plazmatického homocysteinu. Ženy před menopauzou mají nižší koncentrace homocysteinu nalačno i po zátěži než muži, po menopauze se rozdíl mezi pohlavími v koncentracích nalačno vyrovnává. Po methioninovém testu dosahují postmenopauzální ženy vyšších koncentrací než muži srovnatelného věku.

Tab. 1: Koncentrace celkového plazmatického homocysteinu u zdravé populace České republiky nalačno. S ohledem na vztah věku a koncentrace plazmatického homocysteinu byli vyšetřeni rozděleni do 3 věkových skupin

Pohlaví	Věk	Počet n=589	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	Medián	90 %	95 %
Muži	18-35	42	10,3	10,1	12,9	14,0
	36-50	110	10,8	10,3	13,7	14,9
	51-65	132	10,8	10,1	14,9	16,4
Ženy	18-35	50	8,9	8,5	12,2	14,8
	36-50	120	8,8	8,5	11,5	13,1
	51-65	135	10,3	9,5	13,9	16,7

Tab. 2: Koncentrace celkového plazmatického homocysteinu u zdravé populace České republiky po 6 hodinách methioninového testu

Pohlaví	Věk	Počet n=589	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	Medián	90 %	95 %
Muži	18-35	42	37,1	33,5	52,9	56,6
	36-50	110	37,9	35,4	49,3	56,5
	51-65	132	36,1	34,4	48,2	55,6
Ženy	18-35	50	34,4	32,6	51,6	56,5
	36-50	120	34,7	33,0	50,5	58,7
	51-65	135	43,5	39,2	62,4	72,4

ZÁVĚR

Homocystein nalačno i po stimulaci methioninovým zátěžovým testem by měl být v dnešní době vyšetřen u rizikových skupin jmenovaných v doporučení AHA. Provedení methioninového zátěžového testu není provázeno podle dostupné literatury významnými komplikacemi. Potvrdí-li prospektivní studie mírnou hyperhomocysteinémií jako skutečné riziko vzniku aterosklerózy, pak je methioninový zátěžový test elegantním prostředkem k diagnostice poruch metabolismu homocysteinu u osob, u kterých mohou být hodnoty homocysteinu nalačno v normě.

LITERATURA

1. Acosta PB, Yannicelli S. The Ross Metabolic Formula System Nutrition Support Protocols; Ross Laboratoires 1997: 159.
2. Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Williams RR, Ellison RC, Selhub J. Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 147-151.
3. Bostom AG, Roubenoff R, Dellaripa P. Validation of abbreviated oral methionine-loading test. *Clin Chem* 1995; 41: 948-949.
4. Dědina M. Acimethin Gry-Pharma 1995. AISLP; článek 83254.
5. Český lékopis 1997, doplněk 1999. Grada 1999: 4535-4537.
6. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (suppl 2): S40-S44.
7. Fowler B, Sardharwalla IB, Robins AJ. The detection of heterozygotes for homocystinuria by oral loading with L-methionine. *Biochem J* 1971; 122: 23-24.
8. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, Mc Master D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales-Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andria G. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277/22: 1775-1781.
9. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiols compounds are related to food intake in healthy subjects. *J Nutr* 1994; 124: 1934-1941.
10. Hladovec J, Sommerová Z, Písaříková A. Homocysteinemia and endothelial damage after methionine load. *Tromb Res* 1997; 88: 361-364.
11. Chao CL, Kuo TL, Lee YT. Effects of methionine-induced

12. Kang SS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999; 99: 1156-1160.
13. Chambers JC, Obeid OA, Kooner JA. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2922-2927.
14. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999; 100/11: 1161-1168.
15. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 279-298.
16. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992, 12: 279-298.
17. Lambert J, van den Berg M, Steyn M, Rauwerda JA, Donker AJ, Stehouwer CD. Familial hyperhomocysteinemia and endothelium-dependent vasodilatation and arterial distensibility of large arteries. *Tromb Haemost* 1997; 77: 1077-1080.
18. Lindgren A, Brattstrom L, Norrving B, Hultberg B, Andersson A, Johansson BB. Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke* 1995; 26: 795-800.
19. Mayer O jr, Šimon J, Rosolová H. Pohlavní rozdíly v sérových hladinách homocysteinu a asociovaných faktorech. *Čas Lék čes* 1999; 17: 525-527.
20. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare providers. *Circulation* 1999; 99: 1156-1160.
21. Sperandio MP, Candito M, Sebastio G. Homocysteine response to methionine challenge in four obligate heterozygotes for homocystinuria nad relationship with cystathionine beta-synthase mutations. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19: 351-356.
22. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 473-501.
23. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Anderson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and clinical application. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-1779.
24. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inemia : restoration by folic acid. *Clin Sci* 1999; 96/3: 235-239.
25. Zschocke J, Hoffmann GF. *Vademecum Metabolicum, Diagnose und Therapie erbliche Stoffwechselkrankheiten*. Schattauer 1999: 34.

MUDr. Andrea Vítová
Ústav lékařské chemie a biochemie 3. LF UK
Ruská 87
100 00 Praha 10
E-mail: andrea.vitova@lf3.cuni.cz

3.3.2

Methionine- loading test: evaluation of adverse effects safety in an epidemiological study

Clinical Nutrition., 2002

ORIGINAL ARTICLE

Methionine-loading test: evaluation of adverse effects and safety in an epidemiological study

L. KRUPKOVÁ-MEIXNEROVÁ,* K. VESELÁ,† A. VÍTOVÁ,† B. JANOŠÍKOVÁ,* M. ANDĚL,† V. KOŽICH*

*Institute of Inherited Metabolic Diseases, Charles University-1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; †2nd Department of Internal Medicine, Charles University-3rd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic (Correspondence to: VK, Institute of IEM, Charles University, 1st Faculty of Medicine, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic)

Abstract—Background: Methionine loading test is commonly used to detect hyperhomocysteinemia in patients with arteriosclerosis and other conditions. As administration of methionine causes endothelial dysfunction in laboratory examinations, we explored whether loading with this compound leads to clinically relevant adverse effects, especially in vasculature. **Methods and results:** When studying genetic factors in arteriosclerosis we recorded acute complications during a standard methionine loading test (with a dose of 100 mg/kg bw) and assessed a 30-day mortality in a group of 296 patients with coronary artery or peripheral arterial disease and in 591 controls. Acute complications were observed in 33% of the women and 16.5% of the men. For each sex, the patients and controls exhibited the same proportion of complications. The most common symptom, dizziness, was attributable to methionine loading. In addition, isolated sleepiness, nausea, polyuria and decreased or increased blood pressure were observed in part of the subjects. None of the 887 individuals died within the 30-day period following the test. **Conclusion:** Our study suggests that although standard loading with L-methionine frequently causes transitory complications impairing perception and vigilance, the test does not have serious adverse effects on vasculature and may be considered a safe procedure. © 2002 Elsevier Science Ltd.

Key words: homocysteine, methionine loading test, arteriosclerosis, adverse effects, safety, mortality

Introduction

The methionine loading test (MLT) is a widely used diagnostic tool to detect abnormal metabolism of homocysteine in patients with various conditions. An oral load with L-methionine was first reported in homocystinuric patients (1), and was subsequently adapted as a test to detect heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency (2, 3).

Following reports on deranged homocysteine metabolism in patients with arteriosclerosis (4), MLT started to be widely used to examine the putative heterozygosity for CBS deficiency (5) in patients with premature arteriosclerosis (6, 7). Although subsequent molecular studies in patients with arteriosclerosis did not confirm heterozygosity for inactivating mutations in the CBS gene (8, 9), methionine loading test remained a widely accepted procedure in arteriosclerosis research. It was shown previously that elevated homocysteine concentration was present in 60% of persons in fasting plasma samples, while in the remaining 40% of individuals hyperhomocysteinemia was apparent only in the post-load specimens (10). In the opinion of the American

Heart Association, the MLT should be performed in persons with high risk of arteriosclerosis and normal fasting total homocysteine concentrations (11).

Different MLT protocols are used by different investigators (12). The most common protocol includes a single oral dose of 100 mg/kg bw of L-methionine dissolved in fruit juice, which is given to subjects who have fasted overnight. Venous blood is drawn prior to methionine administration, and then 2 to 8 hours after the load.

Endothelial desquamation following methionine loading was described two decades ago (13). Recently, several reports showed that MLT impairs endothelium dependent relaxation of larger arteries (14–17) and reduces cerebral blood flow (18). All these studies suggest that MLT, a commonly used diagnostic procedure, may have adverse effects on vasculature. These functional disturbances could be especially important in individuals with pre-existing endothelial dysfunction such as in patients with arteriosclerosis (19).

In 1998, we initiated a study on genetic factors and homocysteine metabolism in coronary artery disease (Janošíková et al., manuscript in preparation). At that time we were unable to find in the literature any detailed reports on safety and clinically relevant adverse effects of methionine loading on vasculature or other systems. To determine whether MLT may be considered a safe diagnostic procedure we explored acute and subacute

adverse effects and a 30-day mortality following MLT in a cohort of 887 subjects, who participated in the genetic study.

Subjects and methods

Subjects

All subjects were recruited for a study of genetic factors in arteriosclerosis, which was performed in our departments between 1998 and 2000. Patients suffered from coronary artery disease (CAD) (> 50% obliteration of a major coronary vessel on coronarography) or peripheral arterial disease (PAD) of lower limbs (a decrease of more than 10 mm Hg in ankle blood pressure, using Doppler examination, as compared to arm blood pressure).

A total of 296 patients with arteriosclerosis from Prague and central Bohemia were recruited 3 to 6 months after coronarography, acute myocardial infarction, or ultrasound of peripheral arteries. In addition, 591 controls exhibiting no clinical signs of arteriosclerosis and lacking a personal history of CAD, PAD, or stroke and coming from the same geographical region took part in the study. The controls were recruited from health clinics, general practitioners' offices, and community health days, and by advertising in two company bulletins. A detailed description of both groups of subjects is given in Table 1. The study was approved by the Ethics Committee of Charles University, 1st Faculty of Medicine, and all persons gave their written informed consent prior to the MLT. The controls were paid for their participation in the study.

Methionine loading test

Throughout the study we strictly adhered to the protocol and excluded all non-compliant individuals from the final analysis. The subjects fasted for at least 12 hours, from midnight they reduced the intake of fluids, stopped smoking, and in the morning refrained from taking any medication. After a short explanation of the purpose of the study, subjects were informed in their

native language about possible risks of MLT as follows: 'Methionine intake usually does not cause serious adverse effects in humans. Under exceptional circumstances methionine administration may cause short-term stomach-ache or headache. Please advise the medical personnel about any complaints you may have.' After it was ascertained that subjects had adhered to the protocol, initial objective signs were recorded. After the first blood drawing all subjects obtained at 8 am a standard dose of methionine (100 mg/kg bw) dissolved in 300–500 ml of fruit juice, which was consumed within 10 min. Methionine was obtained from Ajinomoto Co., Inc., Japan; five different lots were utilized between 1998 and 2000. Medication, if necessary, was given with a subsequent low protein breakfast containing approximately 10 mg methionine and 350–600 kcal. Between the first and the second blood drawing at 2 pm subjects remained ambulatory. The total blood loss during the MLT was 25–40 ml. In 231 persons exhibiting mild hyperhomocysteinemia (fasting total plasma homocysteine > 15 µmol/l), dietary measures and multivitamin usage were recommended (11). Of these, a control MLT was performed in 140 persons within 3–4 months.

Acute complications of MLT

To ascertain possible subjective complications the persons were asked how they felt prior to the test, 30 min after the test began, and during the physical examination (i.e. 60–180 min after methionine administration). The interval was proportionally shortened for subjects complaining of any problems.

Blood pressure and heart rate were measured and recorded at the same intervals as above. The blood pressure and heart rate of subjects who complained of any unusual feelings were measured more frequently. A neurological examination aimed at cerebellar functions was performed, including the assessment of stance, gait, coordination, and sensation.

Analysis of subacute adverse effects and a 30-day mortality

To examine whether MLT could result in possible subacute or lethal complications we combined data from interviews during repeated methionine loading tests, questionnaire survey and the death register search (for details see Fig. 1). The interviews aimed at clinical worsening of pre-existing CAD, PAD, or recurrence of stroke, or at a novel occurrence of CAD, PAD or stroke within 30 days after the test were performed in all subjects presenting at a second MLT. The questionnaires, inquiring about the same putative complications were sent to all persons who were not subjected to a control MLT. These 747 individuals obtained, within 6–24 months after the MLT, a simple questionnaire; replies were received from 579 persons (a response rate of 78%).

Table 1 Study subjects

	Patients	Controls
Number of persons	296	591
Median age	56	50
Sex, % males	82	48
Hypertension	163 (55%)	79 (13%)
Diabetes mellitus	71 (24%)	23 (4%)
CAD	278 (94%)	–
- MI	208	–
- AP	65	–
- other	5	–
PAD	18 (6%)	–

CAD, coronary artery disease; PAD, peripheral arterial disease; MI, acute myocardial infarction; AP, angina pectoris.

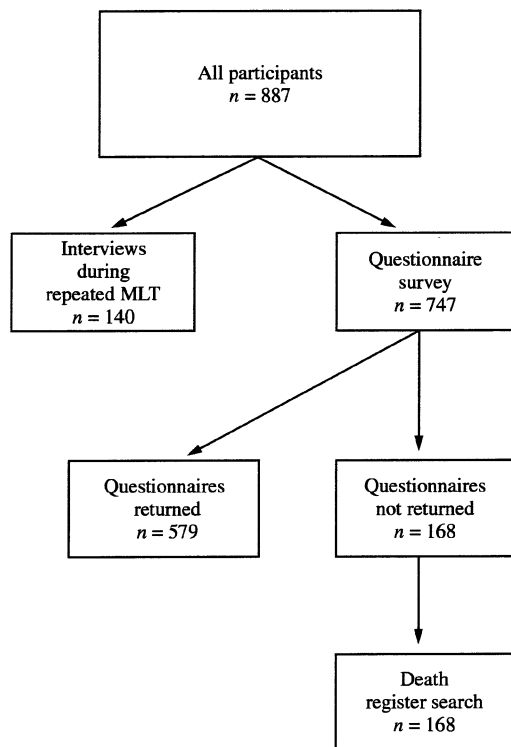


Fig. 1 Analysis of subacute adverse effects and mortality. Interviews and questionnaires contained questions on self-reported novel occurrence, recurrence or worsening of CAD, PAD or stroke.

Mortality within 30 days after the MLT was analyzed in all participants by combining data from interviews, questionnaire survey and a search in death register. The latter analysis was done in 168 individuals by submitting their identifiers to the death register in the Institute of Health Information and Statistics, Prague, and subsequent examination of the date and cause of death in each person who was found in the register.

Statistical methods

Categorical variables were counted for each group, proportions were expressed as percents, and the difference in distribution between groups was assessed by the χ^2 test. The difference in distribution of continuous variables between groups was assessed by the Mann-Whitney rank sum test. Tests were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Acute complications of MLT

Within six hours of methionine ingestion, subjective and objective complaints were observed in 23% of the 887 loaded subjects. The distribution of symptoms and signs is summarized in Table 2. The major transient complications were dizziness (13%), sleepiness (4%), nausea

(3%), and decreased or increased blood pressure (3%). In two individuals, a serious worsening of the overall clinical condition necessitated admission to hospital.

The symptoms and/or signs were isolated in 154 individuals, whereas in the remaining 51 persons a combination of symptoms/signs was present. Of the 51 persons exhibiting combinations, 44 cases involved dizziness. Table 2 shows only the major complaint from each combination of symptoms/signs.

The prevalence of complications was significantly lower in men than in women (16.5% vs 33%, $\chi^2 = 30.9$, $P < 0.00001$). For each sex, however, the prevalence of complications in controls was similar to that in patients (15% vs 18% $\chi^2 = 0.49$, $P = 0.48$ for men, and 33% vs 30% $\chi^2 = 0.20$, $P = 0.65$ for women, respectively).

Dizziness: a typical complication of MLT

Dizziness was described spontaneously by 13% of all subjects as lightheadedness, insecurity in space, drunkenness, or motion sickness. These symptoms appeared usually within 1–2 hours after methionine ingestion, ranging between 30 min and 4 hours. In one third of individuals dizziness was combined with other symptoms, most frequently with nausea and sleepiness.

To examine the possible systemic or cerebral vascular origin of dizziness we analyzed blood pressure, heart rate, age, and the use of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors in individuals with and without dizziness. The MLT did not lead to any significant changes in systolic and diastolic blood pressure in both groups of persons. In non-hypertensive controls, persons who subsequently developed dizziness have had significantly lower median diastolic pressure at the baseline than individuals without dizziness (median diastolic blood pressure 80 torr vs 85 torr, $P < 0.02$). As shown in Table 3 aging did not influence the prevalence of dizziness. The use of ACE inhibitors did not change the prevalence of dizziness as demonstrated by similar proportion of ACE inhibitor users among hypertensive patients who complained of dizziness and those who did not. A more detailed neurological examination was performed 60 to 180 min after methionine ingestion in all individuals suffering from dizziness. Ataxia, dysmetria, dysdiadochokinesia, nystagmus, or abnormal passivity were not present in these individuals demonstrating that dizziness is not associated with a gross cerebellar dysfunction.

Serious complications related to MLT

In two patients, serious alteration of their overall status prompted admission to hospital. The case reports are given below.

The first case was a 65-year-old man with a history of coronary artery disease and peptic ulcer. Four hours after methionine administration he complained about weakness, nausea, stomach-ache and dizziness, without

Table 2 Distribution of acute complications of MLT

	Number of individuals	Number of subjective complications			Number of objective complications			Total complications
		Dizziness	Nausea	Sleepiness	Increased diuresis	Serious complications	Decreased or increased blood pressure	
PATIENTS								
Men	243	20	6	10	–	2	5	43
Women	53	8	4	2	–	–	2	16
Total	296	28	10	12	0	2	7	59
CONTROLS								
Men	285	24	3	9	1	–	7	44
Women	306	66	10	13	1	–	12	102
Total	591	90	13	22	2	0	19	146
TOTAL subjects	887	118	23	34	2	2	26	205
% of subjects		13.4	2.6	3.8	0.2	0.2	2.9	23.1

Table 3 Prevalence of dizziness

	<i>n</i>	With dizziness	Without dizziness	χ^2	<i>P</i>
Men					
Age < 52	235	16	219	1.29	0.256
Age ≥ 52	293	28	265		
Women					
Age < 52	198	45	153	1.2	0.273
Age ≥ 52	161	29	132		
Individuals treated for hypertension					
ACE Inhibitors	101	13	88	0.01	0.909
Other Therapy	127	17	110		

χ^2 test was used to compare the prevalence of dizziness in the group of individuals below and above the median age (52 years); this analysis was done separately for both sexes. In addition, prevalence of dizziness was compared in subjects treated for hypertension by ACE inhibitors, and by other medication. *P* significance of differences in proportions between all compared groups.

chest pain or dyspnea. After vomiting repeatedly yellow fluid without any blood admixture the patient was admitted to hospital. His detailed history revealed that three weeks before the MLT he had discontinued his antiulcerogenic therapy, and in the last two weeks before the test he observed increased frequency of fasting and nocturnal stomach-ache. Laboratory examinations including CK-MB were normal. The complaints decreased a few hours after admission; the patient was dismissed the next day, after refusing additional examinations. The most likely cause of his pre-admission complaints was the exacerbation of his peptic ulcer, although a transient ischemic attack cannot be excluded.

The second case was a 65-year-old man with a history of hypertension, coronary heart disease treated by bypass surgery, recurrent transient ischemic attacks, and stroke. The patient suffered from repeated attacks of unconsciousness of unclear cause. His morning blood pressure on the day of the MLT (without chronic antihypertensive medication) was 200/120 torr, and it normalized after a single dose of captopril. The patient

was found unconscious near our clinic on his way home, 270 min after the beginning of MLT. He recovered spontaneously within a few seconds. During a 12-day admission the patient complained once more about dizziness and nausea, without unconsciousness, chest pain, or dyspnea. Laboratory tests, including CK-MB, ECG, and Holter monitoring, were negative, and the results of a neurological examination were normal. An EEG, cerebral angiography, and MRI were recommended but not performed. During hospital admission no explanation for the patient's attack of unconsciousness was found. The possible causes include syncope, uncontrolled hypertension or transient ischemic attacks. Again, we were unable to determine whether there was a causal relationship between the MLT and the observed clinical problems.

Assessment of subacute adverse effects and mortality within a 30-day period after MLT

The possibility of subacute or lethal complications of MLT were analyzed by combining data from interviews during repeated methionine loading tests, questionnaire survey and death register searches (see Fig. 1). The interviews and questionnaire replies were available in 719 individuals. None of the subjects complained about clinical worsening of pre-existing CAD, PAD, or recurrence of stroke, or novel occurrence of CAD, PAD or stroke within 30 days after the test; in 38 subjects self-reported clinical worsening of arteriosclerosis occurred after this 30-day period.

Mortality within 30 days after the MLT was analyzed in all participants. In the questionnaire survey two respondents deceased due to cardiovascular complications 5 and 9 months after the MLT (the questionnaires were returned by their relatives). In the death register we found 3 additional patient deaths due to cardiovascular complications, all within 5–7 months after the test. In summary, no lethal complications related to the MLT were observed in the one-month interval following methionine loading.

Discussion

Methionine, a normal component of alimentary proteins, may be considered a harmless compound. As western diets contain 1.6–2.8 grams of methionine per day (20) the standard dose of methionine used in MLT (i.e. 100 mg/kg) exceeds its usual daily intake approximately 2.5 to 4 times. Methionine is also used in parenteral amino acid solutions or given orally in dermatology. In addition, many studies employing doses of 70–300 mg of methionine per kg were conducted in patients with schizophrenia in the 1970s (21). Although a variety of symptoms was observed in the latter group, serious complications of methionine administration were not reported in studies of schizophrenia or other conditions.

Acute methionine administration in a dose used in our study, however, has been shown to elicit endothelial cell desquamation (22), and also to impair the reactivity of major vessels due to endothelial dysfunction (14–16). Since endothelial dysfunction is an important pathogenic mechanism in arteriosclerosis (19), there was a possibility that MLT might seriously impair vasculature, especially in individuals with preexisting conditions. If the MLT had caused significant vasoconstriction with impaired perfusion of vascular beds, that would have resulted in an increased prevalence of myocardial infarction, unstable angina, or stroke, especially in patients with arteriosclerosis.

In our analysis, we considered a 30-day interval following the MLT to be the most likely period allowing for manifestation of any possible serious complications or death. By using a combination of questionnaire survey and a search in the death register we were able to analyze the MLT related deaths in all subjects from the study. In the 30-day interval none of the 887 persons in our study died of cardiovascular or cerebrovascular complications. This data in a large cohort of controls and patients with CAD or PAD clearly show that methionine loading is not associated with an increased cardiovascular mortality.

In addition, our study did not detect any subacute adverse effects of MLT. In 719 individuals interviews and questionnaires did not find any single case in which the MLT would have led to a worsening of CAD, PAD, or cerebral ischemia in patients, or would have precipitated the manifestation of the disease in healthy controls. However, validity of these findings is limited due to self-reporting and the lack of objective examinations. In addition, we cannot exclude that transient non-lethal impairment did not occur in any of the 168 non-respondents in the survey. Nor can it be excluded that the two serious complications, which necessitated admission to hospital, were in fact related to the MLT; nevertheless, these patients' histories suggest that these adverse reactions were a result of other conditions. Although endothelial dysfunction was demonstrated in other studies, our data suggest that the MLT probably

does not impair perfusion of vascular beds to an extent that would become clinically detectable.

By contrast, moderate adverse reactions during the MLT were common, usually subjective, and lasted only a few hours. Dizziness, isolated or combined with nausea and sleepiness, was the most frequent adverse reaction observed in our study. Interestingly, dizziness was previously observed in 16.9% of schizophrenic patients following methionine administration (21). Taken together, these observations suggest that dizziness is a specific adverse reaction to methionine administration. Since the mechanisms leading to dizziness after the MLT are unclear, we examined whether the abnormalities in systemic or cerebral circulation may have contributed to this symptom. In subjects complaining of dizziness lower diastolic blood pressure at baseline suggests that this symptom may in part be associated with abnormal regulation of vessel tone. As the MLT alters cerebral blood flow, especially in elderly persons, and this impairment is prevented by the use of ACE inhibitors (18), we also analyzed the role these variables played in the prevalence of dizziness. Neither the age nor the use of ACE inhibitors influenced the prevalence of dizziness; therefore, these data do not support the hypothesis that dizziness was caused by impaired cerebral blood flow. In summary, we did not observe impaired systemic or cerebral circulation as a cause of dizziness; the mechanism(s) leading to dizziness during MLT remain to be determined.

Additional transitory complications of MLT included isolated nausea, sleepiness and polyuria. Isolated nausea may have been related to the intake of large volumes of fruit juice and an unusual low-protein breakfast. Sleepiness alone seems to be attributable to the disturbed biorhythm, especially in individuals coming for the MLT after night shifts or travelling to Prague from distant parts of central Bohemia. Since there was no measurement of urine volume during the MLT the two complaints of polyuria were not verified, and their relation to the MLT remains unclear.

To conclude: in a large group of 887 individuals, transitory subjective complications of the MLT were observed in 1/3 of the women and 1/6 of the men. Dizziness seems to be the most common and specific adverse effect of the MLT. None of the individuals reported worsening or novel occurrence of arteriosclerosis, and none of the study subjects died due to cardiovascular complications in the one-month period following the MLT. All these data suggest that MLT may be considered a safe procedure.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Jan Svatoš of the EUROMise Center in Prague for help with statistical analysis, to numerous clinicians for ascertaining the controls, to Dr Harvey Mudd for providing specific references and to Mr Derek Paton for language editing. The analysis of mortality was kindly performed by Dr. Jiří Holub at the Institute of Health Information and Statistics, Prague. This project was supported

by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NM-26/3 and No. NM-6548/3, and in part by the research project of the Charles University, 1st Faculty of Medicine, No. VZ 111100003.

References

- Carson N A J, Cusworth D C, Dent C E, Field C M B, Neill D W, Westall R G. Homocystinuria: A new inborn error of metabolism associated with mental deficiency. *Arch Dis Child* 1963; 38: 425–436
- Fowler B, Sardharwalla I B, Robins A J. The detection of heterozygotes for homocystinuria by oral loading with L-methionine. *Biochem J* 1971; 122: 23P–24P
- Sardharwalla I B, Fowler B, Robins A J, Komrower G M. Detection of heterozygotes for homocystinuria. Study of sulphur-containing amino acids in plasma and urine after L-methionine loading. *Arch Dis Child* 1974; 49: 553–559
- Wilcken D E, Reddy S G, Gupta V J. Homocysteinemia, ischemic heart disease, and the carrier state for homocystinuria. *Metabolism* 1983; 32: 363–370
- Boers G H, Fowler B, Smals A G et al. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. *Hum Genet* 1985; 69: 164–169
- Boers G H, Smals A G, Trijbels F J et al. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; 313: 709–715
- Clarke R, Daly L, Robinson K et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149–1155
- Kozich V, Kraus E, de Franchis R et al. Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: examination of cystathionine beta-synthase alleles at the molecular level. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 623–629
- Tsai M Y, Welge B G, Hanson N Q et al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis* 1999; 143: 163–170
- Bostom A G, Jacques P F, Nadeau M R, Williams R R, Ellison R C, Selhub J. Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 147–151
- Malinow M R, Bostom A G, Krauss R M. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999; 99: 178–182
- Silberger J, Dudman N. Methionine loading. In: Carmel R, Jacobsen DW (eds) *Homocysteine in health and disease*. Cambridge University Press: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 2001; 212–219
- Hladovec J. Experimental homocystinemia, endothelial lesions and thrombosis. *Blood Vessels* 1979; 16: 202–205
- Bellamy M F, McDowell I F, Ramsey M W et al. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998; 98: 1848–1852
- Chambers J C, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid O A, Kooner J S. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999; 99: 1156–1160
- Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clin Sci (Colch)* 1999; 96: 235–239
- Kanani P M, Sinkey C A, Browning R L, Allaman M, Knapp H R, Haynes W G. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* 1999; 100: 1161–1168
- Chao C L, Lee Y T. Impairment of cerebrovascular reactivity by methionine-induced hyperhomocysteinemia and amelioration by quinapril treatment. *Stroke* 2000; 31: 2907–2911
- De Caterina R. Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 453–467
- Shoob H D, Sargent R G, Thompson S J, Best R G, Drane J W, Tocharoen A. Dietary methionine is involved in the etiology of neural tube defect-affected pregnancies in humans. *J Nutr* 2001; 131: 2653–2658
- Cohen S M, Nichols A, Wyatt R, Pollin W. The administration of methionine to chronic schizophrenic patients: a review of ten studies. *Biol Psychiatry* 1974; 8: 209–225
- Hladovec J, Sommerova Z, Pisarikova A. Homocysteinemia and endothelial damage after methionine load. *Thromb Res* 1997; 88: 361–364

Submission date: 29 May 2001 Accepted: 29 October 2001

3.3.3

Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease

Molecular Genetics and Metabolism 2003

Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease

Bohumila Janošíková,^{a,1} Markéta Pavlíková,^{b,1} Dora Kocmanová,^b Andrea Vítová,^c
Kamila Veselá,^c Lucie Krupková,^a Regina Kahleová,^a Jakub Krijt,^a Pavel Kraml,^c
Josef Hyánek,^d Jana Zvárová,^b Michal Anděl,^c and Viktor Kožich^{a,*}

^a Institute of Inherited Metabolic Diseases, Charles University—1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

^b EuroMISE Center, Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

^c 2nd Department of Internal Medicine, Charles University—3rd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

^d Department of Clinical Biochemistry, Hematology and Immunology, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

Received 14 January 2003; received in revised form 25 April 2003; accepted 25 April 2003

Abstract

It is unresolved whether elevated homocysteine in coronary artery disease (CAD) is the cause of arteriosclerosis or its consequence. In contrast, genetic variants of enzymes that metabolize homocysteine cannot be altered by arteriosclerosis. Consequently, their association with CAD would permit to imply causality. We modeled by regression analysis the effect of 11 variants in the methionine cycle upon CAD manifestation in 591 controls and 278 CAD patients. Among the examined variants only the carriage for the c.844ins68 in the cystathionine β -synthase (CBS) gene was associated with a significantly lowered risk of CAD (OR = 0.56; 95% CI = 0.35–0.90 in the univariable, and OR = 0.41, 95% CI = 0.19–0.89 for obese people in the multivariable analysis, respectively). Healthy carriers of the c.844ins68 variant exhibited, compared to the wild type controls, significantly higher postload ratios of blood *S*-adenosylmethionine to *S*-adenosylhomocysteine (61.4 vs. 54.9, $p = 0.001$) and of plasma total cysteine to homocysteine (8.6 vs. 7.3, $p = 0.004$). The changes in these metabolites are compatible with an improved methylation status and with enhanced activity of homocysteine transsulfuration. In conclusion, the coincidence of clinical and biochemical effects of a common c.844ins68 CBS variant supports the hypothesis that compounds relating to homocysteine metabolism may play role in the development and/or progression of CAD.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Coronary disease; Risk factors; Genes; Homocysteine; Metabolism

Introduction

The causes of arteriosclerosis, and in particular of the coronary artery disease (CAD) have been extensively studied in the past few decades. However, the currently recognized risk factors explain only about one half of the arteriosclerosis incidence [1], and additional risk factors are searched for. Mildly elevated plasma homocysteine concentration has been consistently associated with vascular disease in a number of epidemiological observations with retrospective design [2]. In

studies with prospective design the association of hyperhomocysteinemia with vascular disease is weaker, nevertheless it is statistically significant in most cases [3,4]. However, it is currently unknown whether homocysteine is a primary cause of arteriosclerosis [2,4] or whether it is only a secondary marker of the vascular disease [5].

In contrast to metabolite levels that can change secondarily due to the vascular disease itself [6,7], allelic variants in enzymes metabolizing homocysteine are fixed at conception and do not change throughout life. Assuming “mendelian randomization,” association of genetic variants with the studied trait in case-control studies may suggest causality [8]. Therefore association of polymorphisms of the methionine cycle with CAD, if

* Corresponding author. Fax: +420/224919392.

E-mail address: vkozych@lf1.cuni.cz (V. Kožich).

¹ These two authors contributed equally to this work.

observed, would suggest that genetically determined alterations in metabolism of homocysteine and related compounds are the cause or modifier of arteriosclerosis rather than its consequence.

Approximately 10 common genetic variants in the enzymes of the methionine cycle have been reported [9,10]. Only the c.677C>T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase was extensively studied in arteriosclerosis. Its association with CAD was lately established in a large meta-analysis [11] involving 11,162 cases and 12,758 controls. This meta-analysis [11] estimated that OR for 677TT genotype vs. 677CC genotype was 1.16 (95% CI 1.05–1.28). The association of common polymorphisms in other genes of the methionine cycle with arteriosclerosis was analyzed in only a limited number of studies and remains to be determined.

In our study we examined the association of selected genetic variants in the methionine cycle with the risk of CAD. We analyzed the prevalence of five rare and of six common allelic variants in the cystathionine β -synthase (CBS), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) genes in 278 patients with CAD and 591 controls. All study subjects underwent the standard methionine loading test (MLT) with determination of plasma homocysteine and other aminothiols, and of selected vitamins. The association of the genetic variants with the risk of CAD was modeled by multivariable logistic regression analysis to account for conventional risk factors and other confounders. Only one variant was consistently associated with a decreased risk of CAD. In a subset of controls carrying this variant and in closely matched wild type controls we determined the blood concentrations of additional intermediates of the methionine cycle. Based on these analyses, we hypothesize on the possible role of homocysteine and related sulphur metabolites in arteriosclerosis.

Methods

Subjects

Patients were recruited from the Cardiology Department of the 2nd Clinic of Internal Medicine, Faculty Hospital Královské Vinohrady in Prague. CAD was diagnosed according to WHO criteria, and one or more large stenoses of a major coronary vessel was confirmed by coronarography in all 278 patients. In addition, 591 controls lacking a personal history of CAD, peripheral arterial disease or stroke were recruited from health clinics, general practitioners' offices, on community health days, and by advertising in company bulletins. The study was approved by the Ethics Committee of Charles University—1st Faculty of Medicine; all subjects gave their written informed consent.

Methionine loading and laboratory tests

All study subjects underwent a standard MLT with 100 mg/kg b.w. of L-methionine. Venous blood was collected by venepuncture prior to the test and 6 h after the methionine administration. Aliquots of whole blood were deproteinized within 2 min after the collection by the same volume of 5% perchloric acid, plasma samples were obtained by centrifugation within 30 min after the collection. The fasting blood samples were used for routine biochemical and hematological tests and for determination of erythrocyte and plasma folates, vitamin B₁₂, and B₆ (pyridoxal 5' phosphate). Plasma total and blood non-protein-bound aminothiols homocysteine (Hcy), cysteine (Cys), and glutathione (GSH) were determined by the previously published HPLC method [12]. Selected deproteinized blood samples were used for determination of S-adenosylmethionine (AdoMet) and S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) by tandem mass spectrometry [13]. The intraday and interday coefficients of variation were 6.7 and 7.5% for AdoMet, and 3.9 and 10.4% for AdoHcy, respectively.

Genetic analyses

In all study subjects we determined 11 genetic variants in four enzymes of the methionine cycle. We used PCR with allele specific primer pairs (ARMS-PCR) to examine the following five rare pathogenic homocystinuric mutations c.341C>T (A114V), c.833T>C (I278T), c.919G>A (G307S), c.1330G>A (D444N), and IVS11-2A>C in the CBS gene. Using ARMS-PCR we also examined the presence of 6 common polymorphisms: c.[833T>C;844ins68] in the CBS gene (further abbreviated as c.844ins68), c.677C>T (A222V), and c.1298A>C (E429A) in the MTHFR gene, c.2756A>G (D919G) in the MTR gene and c.66A>G (I22M) and c.524C>T (S175L) in the MTRR gene. Sequences of PCR primers and conditions for amplification can be found in Tables 1 and 2.

Statistical analyses

Descriptive characteristics, metabolite levels and genotype frequencies between patients and controls were compared by univariable analyses using χ^2 or Mann-Whitney test, when appropriate. The association of the common genetic variants with the risk of CAD was modeled by logistic regression analysis. As a measure of this association we calculated odds ratios for individuals homozygous for the rare allele in comparison to individuals homozygous for the wild type allele. Two polymorphisms with the frequency of the rarer allele below 0.2 (the c.844ins68 in the CBS and the c.2756A>G in the MTR genes, respectively) yielded too few homozygotes; for these polymorphisms we combined all car-

Table 1
Primers sequence

	#	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Length (bp)
<i>CBS mutations</i>				
G307S	1	ACAACCTACGAGGTGGAAGGGAAC(GorA)	CGGGGCCTTAATTTTCACACGTTTT	328
A114V	2	TGGCCAAGTGTGAGTTCTTCAAAG(CorT)	CGGATGTCGGCTCGATAATCGTGTC	126
D444N	3	GAGATCCTCCGGGAGAAGGGCTAC(GorA)	GAGGTCTGAGGGCCTGGAGTGAGCA	272
IVS11-2A > C	4	CCCCCGACCTGCCTCTTCCCCC(AorC)	TGGGCAGACAGAACCCAGGACTGAG	210
I278T	5	CCTGAAGCCGCGCCCTCTGCAGATAA(TorC)	GTGGCCGGGCTCTGGACTCGACCTACC	174, 242
<i>Polymorphisms</i>				
CBS c.844ins68	6	CTGCCTTGAGCCCTGAAGCC	CTGGACTCGACCTACCGTCCT	174, 242
MTHFR c.677C > T	7	AGGAGAAGGTGTCTGCGGGTG(CorT)	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	195
MTHFR c.1298A > C	8	GGGAGGAGCTGACCAGTGAGG(AorC)	GGGGCAGGGGATGAACCAG	127
MTR c.2756A > G	9	GGAAGAATATGAAGATATTAGACACG(AorG)	GACTGAAGACCTCTGATTTGAAC	204
MTRR c.66A > G	10	CCCAAGTAGTTTCGAGCCGATCATCTG	AATCCATGTACCACAGCTTGCTCAAA(TorC)	368
MTRR c.524C > T	11	ATTCCGAATGGTCTTCATAG	CACAAGGTCTGTCCGC(AorG)	272

Table 2
PCR conditions

Primer pair(s) #	Concentration of					Reaction volume, µl	Cycling conditions
	dNTPs, µM	Primer, pmol each	MgCl ₂ , mM	Additives	Polymerase, U		
2, 3, 5	200	10	5.75 or 4.5*	5% DMSO	2.5 KlenTaq	20	95/20 s, 40 × (95/5 s, 68/15 s), 68/10 min
1, 4	200	10	3.5	2.5% AA	2.5 KlenTaq	20	95/20 s, 35 × (95/5 s, 66/8 s, 72/15 s), 72/10 min
6	200	5	1.8	—	1.0 Taq	25	95/2 min, 35 × (94/15 s, 62/30 s, 72/40 s), 72/5 min
7, 8	100	10	1.0	—	1.0 Taq	10	94/20 s, 40 × (94/10 s, 63/10 s, 72/20 s), 72/10 min
9	200	10	3.5	—	1.25 KlenTaq	10	95/20 s, 35 × (95/5 s, 59/10 s, 68/25 s), 68/10 min
10	200	10	3.5	5% DMSO	1.25 KlenTaq	10	95/20 s, 35 × (95/5 s, 59/10 s, 68/25 s), 68/10 min
11	200	10	4.5	10% AA	1.25 KlenTaq	10	95/20 s, 40 × (95/5 s, 55/5 s, 68/10 s), 68/10 min

All reactions were performed using 1 × reaction buffers supplied with enzymes; KlenTaq polymerase was from Ab Peptides (St. Louis, MO), Taq polymerase was from Promega (Madison, WI).

DMSO, dimethyl sulphoxid; AA, acetamide; * different MgCl₂ concentrations for amplification of normal or variant allele, respectively.

riers of the rare allele (i.e., both homozygotes and heterozygotes) and the odds ratios were calculated for the carriers compared to the wild type homozygotes. To eliminate possible confounding by the known risk factors the univariable logistic regression analysis was complemented with a multivariable logistic regression model allowing for interactions. The variables included together with the genetic factors into the latter model were age, sex, BMI, waist-to-hip ratio (WHR), hypertension, diabetes, hyperlipidemia, smoking and alcohol consumption. The concentrations of selected metabolites in CBS c.844ins68 carriers, and in their age-, sex-, MTHFR genotype, and menopause status-matched wild

type homozygous counterparts were compared by Wilcoxon signed rank test.

All statistical analyses were carried out using S-plus and R software, the tests were performed at a 5% level of significance.

Results

Study subjects

The distribution of clinical risk factors in 278 patients with coronary artery disease and in 591 controls is

presented in Table 3. As expected, the major conventional risk factors were more prevalent among the patients than in the controls. The aminothiol and vitamin concentrations in studied subjects are presented in Table 4. The patients exhibited higher median levels of homocysteine, cysteine and glutathione, both before and after methionine load. Although the concentrations of plasma vitamin B₆ and plasma and erythrocyte folate were not different, the concentrations of plasma vitamin B₁₂ were significantly lower in patients.

Prevalence of genetic variants

The prevalence of the 11 examined allelic variants in the CBS, MTHFR, MTR, and MTRR genes is sum-

marized in Table 5. We first determined the prevalence of 5 selected pathogenic mutations in the CBS gene to test whether heterozygosity for CBS deficiency may contribute to CAD. Since only one CAD patient was heterozygous for the c.833T > C transition, we conclude similarly to other studies [14,15] that heterozygosity for these selected inactivating mutations in the CBS gene is not a significant contributing factor to the development of CAD in our population. We next determined the allelic frequencies of the six common polymorphisms in the CBS, MTHFR, MTR, and MTRR genes. The allelic frequencies were not statistically different between patients and controls with the exception of the c.844ins68 variant in the CBS gene and the c.66A > G variant in the MTRR gene, which both were more common in controls.

Table 3
Characteristics of studied subjects

	Patients with CAD	Controls	<i>p</i> *
Number of individuals	278	591	
Males, %	84 (79;88)	48 (44;52)	<0.0001
Age, median, years	56 (51;61)	50 (42;55)	<0.0001
WHR, median, m/m	0.94 (0.90;0.97)	0.85 (0.80;0.91)	<0.0001
BMI, median, kg/m ²	28.1 (26.0;30.8)	25.9 (23.4;28.4)	<0.0001
Smoking status, current + former, %	82 (76;86)	42 (38;46)	<0.0001
Smoking ^a , median, packyears	9500 (5100;13,900)	4200 (1650;7950)	<0.0001
Abstainers, %	34 (28;40)	31 (27;35)	0.446
Alcohol consumption ^b , median, g/week	114 (44;200)	95 (40;187.5)	0.150
Hyperlipidemia, %	78 (72;82)	24 (21;28)	<0.0001
Hypertension, %	56 (50;62)	13 (11;16)	<0.0001
Diabetes mellitus, %	25 (20;30)	4 (3;6)	<0.0001
Multivitamin intake, %	20 (16;25)	27 (24;31)	0.0263

Data presented as medians or proportions with 1st and 3rd quartile or 95% CI in parentheses.

A diagnosis of hypertension, diabetes mellitus, or hyperlipidemia was defined as receiving current treatment for or having a past history of the condition.

WHR, waist/hip ratio; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease.

* Univariable analysis for difference in proportions or medians by χ^2 or Mann–Whitney test for discrete and continuous variables, respectively.

^a Current and former smokers only.

^b Non-abstainers only.

Table 4
Aminothiol and vitamin concentrations in studied subjects

	Fasting concentrations			Concentrations 6 h after the methionine load		
	Patients with CAD (<i>n</i> = 278)	Controls (<i>n</i> = 591)	<i>p</i> *	Patients with CAD (<i>n</i> = 278)	Controls (<i>n</i> = 591)	<i>p</i> *
Plasma tHcy, mol/L	11.5 (9.9;14.9)	9.5 (8.1;11.2)	<0.0001	38.9 (32.8;48.7)	35.0 (29.6;42.7)	<0.0001
Plasma tCys, μ mol/L	338 (305;374)	299 (274;328)	<0.0001	315 (287;348)	279 (254;306)	<0.0001
Blood fGSH, μ mol/L	1086 (897;1239)	974 (781;1193)	<0.0001	1079 (930;1232)	995 (758;1169)	<0.0001
Ratio of tCys to tHcy	29.1 (23.5;33.4)	31.6 (26.6;36.5)	<0.0001	8.2 (6.7;9.5)	8.1 (6.6;9.4)	0.368
Plasma folates, nmol/L	14.3 (10.2;19.5)	14.3 (10.8;18.5)	0.898			
Erythrocyte folates, nmol/L	752 (607;936)	735 (596;923)	0.658			
Plasma vitamin B ₆ , μ mol/L	9.5 (5.4;13.3)	9.9 (6.7;13.6)	0.066			
Plasma vitamin B ₁₂ , μ mol/L	262 (200;340)	280 (215;363)	0.012			

Data are presented as medians and 1st and 3rd quartile in parentheses.

tHcy, total homocysteine; tCys, total cysteine; fGSH, non-protein bound (free) glutathione.

* Mann–Whitney test for differences in medians between CAD patients and controls.

Table 5
Prevalence of genotypes

Allelic variant	p^a	Patients with CAD ($n = 278$)				Controls ($n = 591$)			
		Observed genotypes			f^b	Observed genotypes			f^b
		W/W	W/M	M/M		W/W	W/M	M/M	
CBS	0.699	277	1	0	0.002	591	0	0	0.000
Five pathogenic mutations ^a					(0.00–0.01)				(0.00–0.004)
CBS c.844ins68	0.014	253	25	0	0.045	501	88	2	0.078
del > ins ^c					(0.03–0.07)				(0.06–0.09)
MTHFR c.677C > T	0.897	123	117	38	0.347	245	287	59	0.343
A222V					(0.31–0.39)				(0.32–0.37)
MTHFR c.1298A > C	0.156	143	108	27	0.291	264	268	59	0.327
E429A					(0.25–0.33)				(0.30–0.35)
MTR c.2756A > G	0.999	183	82	13	0.194	386	182	23	0.193
D919G					(0.16–0.23)				(0.17–0.22)
MTRR c.66A > G	0.094	60	134	84	0.457	84	320	187	0.413
I22M					(0.41–0.50)				(0.38–0.44)
MTRR c.524C > T	0.374	128	106	44	0.349	241	260	90	0.372
S175L					(0.31–0.39)				(0.34–0.40)

Data presented as numbers of individuals with the respective genotype (W, wild type allele; M, variant type allele).

All alleles except for MTRR alleles were in Hardy–Weinberg equilibrium among both controls and patients.

CBS, cystathionine β -synthase; MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase; MTR, methionine synthase; MTRR, methionine synthase reductase.

^a Difference in frequencies of the rare allele between CAD patients and controls assessed by χ^2 test.

^a The five mutations analyzed were: c.833C > T (I278T), c.919G > A (G307S), c.341C > T (A114V), c.1330G > A (D444N), and IVS11-2A > C; only one heterozygotes for c.833C > T (I278T) was found among the patients.

^b f , prevalence of the rare allele in the respective group with 95% CI given in parentheses.

^c del > ins indicates a change in genotype, from wild type to c.[833C;844ins68].

The distribution of genotypes followed the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in the CBS, MTHFR, and MTR genes. In contrast, the genotype distribution of polymorphisms in the MTRR gene departed from HWE (the c.66A > G in controls and the c.524C > T in patients) prohibiting thus a reliable interpretation of their role in CAD.

The homozygosity for the widely studied c.677C > T variant in the MTHFR gene was associated with a statistically non-significant 28% increase of CAD risk in our study. However, data from our study were included into a large meta-analysis [11], which confirmed that the homozygotes for c.677C > T variant had a significantly higher risk of CAD than wild type homozygotes.

In each of the MTHFR and MTRR genes, we analyzed two different polymorphisms. Similarly to other studies [16,17] we observed a strong linkage disequilibrium between the c.677C > T and the c.1298A > C polymorphisms in the MTHFR gene. In contrast, the analysis did not reveal linkage disequilibrium between the c.66A > G and c.524C > T polymorphisms in the MTRR gene.

We also examined the prevalence of individual variants after stratification by age and sex (data not shown). Among the six common genetic variants only the prevalence of carriers of the CBS c.844ins68 variant seemed to change with age. To analyze the changes of population prevalence of the c.844ins68 variant with age over a larger interval, we combined data from this study with

results from other studies performed in our laboratory (data not shown). The prevalence of the variant allele in the pooled controls group ($n = 1997$) oscillated around 12% between birth and 45 years of age while it increased to 16% in the oldest group (> 45 years); this difference remained nonetheless non-significant (p value 0.25 for the overall difference, 0.11 for two-sided Cochran–Armitage linear trend test). In summary, the different prevalence of the CBS c.844ins68 variant in patients and controls, and the possible change with age suggest that this variant may provide protection against CAD.

Modeling the risk of CAD by logistic regression

The main aim of our study was to examine whether the common allelic variants in the enzymes of the methionine cycle modulate the risk of CAD. In the univariable logistic regression analysis only the carriership for the c.844ins68 variant in the CBS gene was significantly associated with CAD exhibiting a protective effect with an OR = 0.55 (95% CI = 0.35–0.88, $p = 0.015$). Furthermore, the analysis revealed that the conventional cardiovascular risk factors were associated with an increased risk of CAD (see Table 6).

The association of the genetic variants with CAD was also modeled by a multivariable logistic regression analysis to minimize the confounding by established risk factors, and to allow for interactions (see Table 6). The protective effect of the CBS c.844ins68 variant remained

Table 6
Estimates of CAD risk

Factor	Unit of change	Univariable analysis		Multivariable model with interactions	
		Change in OR	95% CI	Change in OR	95% CI
<i>Conventional risk factors</i>					
Gender	Female vs. male	0.18	(0.12;0.25)	0.24	(0.13;0.46)
Age	Per 10 years	3.28	(2.62;4.11)	2.58	(1.84;3.60)
Exposure to smoking	Per 1000 packyears	1.18	(1.15;1.22)	1.14	(1.10;1.18)
Alcohol	Per 100 grams per week	1.00	(0.90;1.12)	0.70	(0.59;0.83)
Hypertension	Yes vs. no	8.41	(6.01;11.76)	6.99	(4.43;11.02)
Hyperlipidemia	Yes vs. no	10.81	(7.70;15.19)	4.48	(2.79;7.20)
Diabetes	Yes vs. no	8.15	(4.95;13.42)	2.82	(1.46;5.44)
BMI	Per 0.1 increase	1.13	(1.09;1.17)	n.s.	
WHR	Per 0.1 increase	5.02	(3.88;6.50)	—	
	For CBS 844 del/del	—		2.57	(1.32;5.03)
	For CBS 844 del/ins + ins/ins	—		0.51	(0.12;2.24)
<i>Genetic factors</i>					
CBS c.844ins68	(ins/ins + ins/del) vs. del/del	0.56	(0.35;0.90)	—	
	For WHR \leq 0.85	—		2.07	(0.56;7.75)
	For WHR $>$ 0.85	—		0.41	(0.19;0.89)
MTHFR c.677	T/T vs. C/C	1.28	(0.81;2.04)	n.s.	
MTHFR c.1298	C/C vs. A/A	0.84	(0.51;1.39)	n.s.	
MTR c.2756	(G/G + G/A) vs. A/A	0.98	(0.72;1.32)	n.s.	
MTRR c.66	G/G vs. A/A	0.63	(0.41;0.96)	0.50	(0.26;0.97)
MTRR c.524	T/T vs. C/C	0.92	(0.61;1.40)	n.s.	

The logistic regression was employed for multivariable analysis. The model was composed of the variables gender, age, exposure to smoking, alcohol consumption, hypertension, hyperlipidemia, diabetes, and BMI as linear regressors, MTHFR c.677, MTHFR c.1298, MTR c.2756, MTRR c.66 and MTRR c.524 with dose–response effect assumption and one interaction between WHR and CBS c.844ins68 carriers. The OR estimates in the multivariable analysis were computed after exclusion of the statistically non-significant variables from the model. The statistical significance level was set to 5%.

WHR, waist/hip ratio; OR, odds ratio; CI, confidence interval; CBS, cystathionine β -synthase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MTR, methionine synthase; MTRR, methionine synthase reductase.

significant also after adjustment for age, sex, smoking, alcohol consumption, hypertension, hyperlipidemia, and diabetes. However, the adjustment for the WHR eliminated the protective effect of c.844ins68 carriership in lean individuals (i.e., with WHR \leq 0.85), while it maintained the protective effect in obese individuals reaching an OR = 0.41 (95% CI 0.19–0.89). The multivariable model also revealed that homozygosity for the c.66A $>$ G variant in the MTRR gene was associated with a decreased risk of CAD (OR = 0.50, 95% CI = 0.26–0.97). As genotypes for the c.66A $>$ G variant did not follow the Hardy–Weinberg equilibrium the data on MTRR cannot be interpreted with confidence.

In summary, logistic regression analysis revealed that carriership for the CBS c.844ins68 variant is consistently associated with a decreased risk of CAD and suggests that this genetic variant may ameliorate the development and/or clinical manifestation of CAD.

Metabolic profile in carriers for CBS c.844ins68

To explore the possible mechanism(s) by which the c.844ins68 protects against CAD, healthy carriers for this variant were examined for levels of intermediates relating to homocysteine metabolism. Concentrations of

total plasma homocysteine and cysteine, and of blood *S*-adenosylmethionine (AdoMet), *S*-adenosylhomocysteine (AdoHcy) and glutathione in carriers for the c.844ins68, and in an equal number of wild-type controls matched for age, gender, menopause, and the MTHFR 677 genotype are shown in Table 7. Comparison of the main clinical characteristics between the matched pairs did not reveal any statistically significant differences (see footnote to Table 7). This similarity of phenotypes permits thus to associate the possible differences in concentrations of homocysteine-relating metabolites with the carriership for the c.844ins68 variant. Under fasting conditions, the metabolite levels were not significantly different between carriers and the wild-type homozygotes with the exception of blood AdoMet. However, methionine loading revealed different functional capacities of carriers compared to the wild-type homozygotes. The postload samples obtained from c.844ins68 carriers exhibited significantly lower blood AdoHcy and plasma total homocysteine, higher blood AdoMet with higher AdoMet to AdoHcy ratio, and higher ratio of plasma cysteine to homocysteine. In conclusion, the metabolic changes in carriers for the CBS c.844ins68 are suggestive of an improved methylation status and of enhanced homocysteine elimination

Table 7
Metabolite profiles in controls with and without c.[833T;844ins68] allele

	Fasting concentrations			Concentrations 6 h after the methionine load		
	Wild type homozygotes (<i>n</i> = 89)	c.844ins68 carriers (<i>n</i> = 89)	<i>p</i> *	Wild type homozygotes (<i>n</i> = 89)	c.844ins68 carriers (<i>n</i> = 89)	<i>p</i> *
Blood AdoMet, μmol/L	2.31 (1.88;2.68)	2.53 (2.18;2.99)	0.025	2.47 (2.18;2.75)	2.61 (2.33;3.04)	0.007
Blood AdoHcy, nmol/L	31.4 (27.1;36.1)	32.2 (28.4;36.6)	0.470	45.7 (39.7;56.8)	44.7 (39.8;51.6)	0.028
Plasma tHcy, μmol/L	9.5 (8.6;11.8)	9.1 (7.8;10.9)	0.176	35.8 (29.0;45.0)	33.9 (28.7;38.2)	0.045
Plasma tCys, μmol/L	302 (274;333)	299 (277;319)	0.319	274 (242;307)	286 (259;305)	0.231
Blood fGSH, μmol/L	987 (801;1134)	918 (760;1137)	0.929	975 (791;1139)	958 (752;1114)	0.655
Ratio AdoMet to AdoHcy	75.5 (62.7;88.0)	81.5 (68.8;91.7)	0.152	54.9 (43.9;64.5)	61.4 (51.5;71.7)	0.0014
Ratio Cys to Hcy	31.3 (25.7;35.5)	32.5 (27.9;37.7)	0.196	7.3 (6.4;9.2)	8.6 (7.0;9.7)	0.004

Data are presented as medians with 1st and 3rd quartiles in parentheses.

The group of carriers consisted of 87 and 2 individuals, who were heterozygous and homozygous for CBS c.844ins68, respectively; the wild type homozygous controls were matched for age, sex, menopause status, MTHFR genotype, and did not differ significantly in the following characteristics: WHR, BMI, smoking status, number of packyears, proportion of abstinent, alcohol consumption, proportion of subjects with hyperlipidemia, hypertension, diabetes mellitus, and multivitamin intake, MTRR66 genotype, plasma and erythrocyte folate and plasma vitamin B₆ and B₁₂ levels (data not shown, Wilcoxon signed rank test for continuous and sign test for discrete variables).

AdoMet, *S*-adenosylmethionine; AdoHcy, *S*-adenosylhomocysteine; tHcy, total homocysteine; tCys, total cysteine; fGSH, non-protein bound (free) glutathione.

* Difference in medians, paired two sample Wilcoxon rank test.

following methionine loading, presumably via the stimulated transsulfuration pathway.

Discussion

The major finding of our study is the association of the CBS c.844ins68 variant with a significantly decreased risk of clinically manifested CAD. The c.844ins68 variant was associated with CAD both in the univariable as well as in the multivariable analysis; the adjustment for the conventional risk factors removed the protective effect of the c.844ins68 in lean individuals while it did not change its protective effect in subjects with the above-median WHR. Interaction of the c.844ins68 variant with WHR is rather surprising. The effect of WHR can be caused by differences in insulin action in obese people. WHR is a measure of abdominal obesity [18], which is one of the features of insulin resistance syndrome. Interestingly, insulin resistance is also associated with impaired homocysteine metabolism [19]; it was shown that high insulin concentrations decrease the activity of transsulfuration pathway at the CBS step [20]. The modulation of insulin resistance syndrome by the enhanced transsulfuration of homocysteine may decrease the risk of developing and/or manifesting CAD. Nevertheless explanation of the protective effect of the c.844ins68 variant in obese individuals against CAD is not clear in present and should be assessed in independent studies.

Our observations concerning 844ins68 variant are in contrast to several previous case-control studies [21–24], which did not reveal any significant association of 844ins68 variant with arteriosclerosis and which did not control for ethnicity and for age [21–24]. However, con-

sidering the influence of ethnicity and possibly of aging on the prevalence of c.844ins68, the lack of association in the above studies may not contradict our findings.

Although we cannot exclude the possibility that the association of the c.844ins68 with CAD in our study may have appeared by chance, additional data support the hypothesis that this genetic variant may indeed protect against CAD. The first support for the presumed protective effect comes from measuring the levels of homocysteine and related metabolites in control subjects, who are lacking the symptoms of CAD. The homocysteine-lowering effect of the CBS variant in these individuals is rather small and it is accompanied by more pronounced changes in concentration of other sulfur metabolites. We therefore propose that the protective effect of the c.844ins68 variant may be due to a combination of its homocysteine-lowering effect via the putatively enhanced transsulfuration, and improved methylations.

Indeed, an activated transsulfuration due to hyperexpression of the CBS gene from three copies of chromosome 21 has been suggested as a cause for lower incidence and slower progression of arteriosclerosis in patients with Down's syndrome [25]. Congruently, the metabolic changes present in the carriers for c.844ins68 are consistent with an enhanced flux of homocysteine through the transsulfuration pathway. Lower postload homocysteine concentration in the c.844ins68bp carriers is a finding similar to previous reports [6,7,26]. In our study the c.844ins68 carriers also exhibited lower AdoHcy postload levels and an increased ratio of postload cysteine to homocysteine, which may be considered an indirect marker of the transsulfuration efficiency. Two molecular studies indirectly suggested that the c.844ins68 allele may be indeed associated with higher CBS activity [27] and with increased amounts of CBS

mRNA [28]. Taken together, the carriership for the c.844ins68 allele may be associated with a more efficient removal of homocysteine from the methionine cycle via the transsulfuration pathway, especially under conditions of high methionine intake.

In addition, impaired methylation has been proposed as a mechanism of endothelial cell dysfunction and vascular smooth muscle cell proliferation upon homocysteine exposure in tissue cultures [29,30] or in CBS deficient mice [29,30]. Methylation reactions, which are carried out by numerous methyltransferases, are generally inhibited by AdoHcy and proceed more efficiently in increased AdoMet concentrations [31]. Lower AdoHcy and higher AdoMet concentrations in the c.844ins68 carriers thus suggest that carriership for the protective CBS variant may be associated with an improved methylation status of vasculature.

Although great care was taken both in the collection of data and their analyses, we are aware of several limitations of our study. Firstly, the case-control design may suffer from disadvantages such as ascertainment bias or the impossibility to resolve cause-and-effect relationships. However, assuming the “mendelian randomization” [8] the feasibility of this approach, complemented with a careful interpretation of the results, justifies its use. Secondly, we used multivariate regression analysis to control for the effect of possible confounders. This approach may suffer from low power due to small number of subjects in different factor combinations groups. On the other hand we maintained the number of entering variables reasonably small to keep the benefits and problems of multivariable approach balanced. Thirdly, our analyses were performed as exploratory and no correction for multivariate testing was used. Therefore, the results should be interpreted with caution and the observed associations should be assessed in independent projects.

In summary, the presented study showed that the c.844ins68 variant in CBS gene decreases the risk of clinically manifested CAD. Our data suggest that this frequent polymorphism may improve the methylation status of vasculature and that it may enhance the removal of homocysteine from the methionine cycle via the transsulfuration pathway. This coincidence of clinical and biochemical effects of a common genetic variant supports the hypothesis that homocysteine and related metabolites may play role in the development and/or progression of CAD.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. P. Widimský for the provision of patient data, Ms. M. Vacková, E. Richterová, and J. Sokolová for their excellent technical assistance, Dr. K. Zvára for his comments on the sta-

tistical analyses, and Ms. K. Vočadlo for her assistance during the editing work. The following collaborators helped to recruit the control subjects for this study: Drs. H. Bálková, L. Černá, M. Hamplová, M. Hotová, M. Kalová, Z. Kasalová, J. Kemmlerová, P. Malík, J. Malinová, V. Mallat, E. Matějková, L. Nováková, K. Obermannová, M. Opltová, J. Psottová, J. Richterová, L. Sochurek, E. Staněk, Z. Stašková, E. Strnadová, and M. Svoboda. This study was supported by a grant from the Grant Agency of Ministry of Health, Czech Republic, Reg. No. NM26-3, in part by Grant NM6548-3 and by the research project of Charles University—1st Faculty of Medicine No. VZ111100003.

References

- [1] E. Braunwald, Shattuck lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 1360–1369.
- [2] K. Robinson, Homocysteine and coronary artery disease, in: R. Carmel, D. Jacobsen (Eds.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, 2001, pp. 371–383.
- [3] P. Verhoef, M. Stampfer, Epidemiology of vascular and thrombotic associations, in: R. Carmel, D. Jacobsen (Eds.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, 2001, pp. 357–370.
- [4] E.S. Ford, S.J. Smith, D.F. Stroup, K.K. Steinberg, P.W. Mueller, S.B. Thacker, Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies, *Int. J. Epidemiol.* 31 (2002) 59–70.
- [5] P.M. Ueland, H. Refsum, S.A. Beresford, S.E. Vollset, The controversy over homocysteine and cardiovascular risk, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (2000) 324–332.
- [6] V. Dekou, V. Gudnason, E. Hawe, G.J. Miller, D. Stansbie, S.E. Humphries, Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men, *Thromb. Haemost.* 85 (2001) 67–74.
- [7] M.Y. Tsai, M. Bignell, F. Yang, B.G. Welge, K.J. Graham, N.Q. Hanson, Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine β -synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels, *Atherosclerosis* 149 (2000) 131–137.
- [8] D. Clayton, P.M. McKeigue, Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases, *Lancet* 358 (2001) 1356–1360.
- [9] J.P. Kraus, J. Oliveriusova, J. Sokolova, E. Kraus, C. Vlcek, R. de Franchis, K.N. Maclean, L. Bao, G. Bukovska, D. Patterson, V. Paces, W. Ansorge, V. Kozich, The human cystathionine β -synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms, *Genomics* 52 (1998) 312–324.
- [10] R. Rozen, Polymorphisms of folate and cobalamin metabolism, in: R. Carmel, D. Jacobsen (Eds.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, 2001, pp. 259–269.
- [11] M. Klerk, P. Verhoef, R. Clarke, H.J. Blom, F.J. Kok, E.G. Schouten, MTHFR 677C \rightarrow T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis, *JAMA* 288 (2002) 2023–2031.
- [12] J. Krijt, M. Vackova, V. Kozich, Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris

- (2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-*n*-butylphosphine, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1821–1828.
- [13] E.A. Struys, E.E. Jansen, K. de Meer, C. Jakobs, Determination of *S*-adenosylmethionine and *S*-adenosylhomocysteine in plasma and cerebrospinal fluid by stable-isotope dilution tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1650–1656.
- [14] V. Kozich, E. Kraus, R. de Franchis, B. Fowler, G.H. Boers, I. Graham, J.P. Kraus, Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: examination of cystathionine β -synthase alleles at the molecular level, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 623–629.
- [15] A.R. Folsom, F.J. Nieto, P.G. McGovern, M.Y. Tsai, M.R. Malinow, J.H. Eckfeldt, D.L. Hess, C.E. Davis, Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, *Circulation* 98 (1998) 204–210.
- [16] N.M. van der Put, F. Gabreels, E.M. Stevens, J.A. Smeitink, F.J. Trijbels, T.K. Eskes, L.P. van den Heuvel, H.J. Blom, A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 1044–1051.
- [17] P.A. Isotalo, G.A. Wells, J.G. Donnelly, Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations, *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 986–990.
- [18] L. Morricone, M. Ferrari, R. Enrini, L. Inglese, D. Giardini, P. Garancini, F. Caviezel, The role of central fat distribution in coronary artery disease in obesity: comparison of nondiabetic obese, diabetic obese, and normal weight subjects, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 (1999) 1129–1135.
- [19] J.B. Meigs, P.F. Jacques, J. Selhub, D.E. Singer, D.M. Nathan, N. Rifai, R.B. D'Agostino, P.W. Sr, Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham offspring study, *Diabetes Care* 24 (2001) 1403–1410.
- [20] A. Dicker-Brown, V.A. Fonseca, L.M. Fink, P.A. Kern, The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine- β -synthase: studies in hepatocytes, *Atherosclerosis* 158 (2001) 297–301.
- [21] M.Y. Tsai, M. Bignell, K. Schwichtenberg, N.Q. Hanson, High prevalence of a mutation in the cystathionine β -synthase gene, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 1262–1267.
- [22] L.A. Kluijtmans, G.H. Boers, F.J. Trijbels, H.M. van Lith-Zanders, L.P. van den Heuvel, H.J. Blom, A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine β -synthase gene, *Biochem. Mol. Med.* 62 (1997) 23–25.
- [23] M. Orendac, B. Muskova, E. Richterova, J. Zvarova, M. Stefek, E. Zaykova, J.P. Kraus, J. Stribrny, J. Hyanek, V. Kozich, Is the common 844ins68 polymorphism in the cystathionine β -synthase gene associated with atherosclerosis? *J. Inherit. Metab. Dis.* 22 (1999) 674–675.
- [24] B. Giusti, O. Camacho-Vanegas, M. Attanasio, P. Comeglio, A.M. Gori, T. Brunelli, D. Prisco, G.F. Gensini, R. Abbate, G. Pepe, Microheterogeneity in the distribution of the 844ins68 in the cystathionine β -synthase gene in Italy, *Thromb. Res.* 94 (1999) 249–254.
- [25] S. Yla-Herttuala, J. Luoma, T. Nikkari, T. Kivimaki, Down's syndrome and atherosclerosis, *Atherosclerosis* 76 (1989) 269–272.
- [26] M.Y. Tsai, F. Yang, M. Bignell, O. Aras, N.Q. Hanson, Relation between plasma homocysteine concentration, the 844ins68 variant of the cystathionine β -synthase gene, and pyridoxal-5'-phosphate concentration, *Mol. Genet. Metab.* 67 (1999) 352–356.
- [27] K.J. Lievers, L.A. Kluijtmans, S.G. Heil, G.H. Boers, P. Verhoef, D. van Oppenraay-Emmerzaal, M. den Heijer, F.J. Trijbels, H.J. Blom, A 31 bp VNTR in the cystathionine β -synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels, *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2001) 583–589.
- [28] B. Muskova, Z. Novotna, Z. Sieglova, M. Janosik, V. Kozich, Polymorphism 844ins68 and CBS mRNA expression. Abstract, *J. Inherit. Met. Dis.* 21 (1998) P40.
- [29] M.E. Lee, H. Wang, Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease, *Trends Cardiovasc. Med.* 9 (1999) 49–54.
- [30] S. Dayal, T. Bottiglieri, E. Arning, N. Maeda, M.R. Malinow, C.D. Sigmund, D.D. Heistad, F.M. Faraci, S.R. Lentz, Endothelial dysfunction and elevation of *S*-adenosylhomocysteine in cystathionine β -synthase-deficient mice, *Circ. Res.* 88 (2001) 1203–1209.
- [31] S. Clarke, K. Banfield, *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases, in: R. Carmel, D. Jacobsen (Eds.), *Homocysteine in Health and Disease*, Cambridge University Press, Cambridge, 2001, pp. 63–78.

3.4.4

Genetic determinants of folate status in Central Bohemia.

Physiological Research 2005

Genetic determinants of folate status in Czech Republic

Kamila Veselá^{1,2}, Markéta Pavlíková³, Bohumila Janošíková¹, Michal Anděl², Jana Zvárová³, Josef Hyánek⁴, Viktor Kožich¹

¹ *Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University-First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic*

² *2nd Department of Internal Medicine, Charles University, Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic*

³ *EuroMISE Center, Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*

⁴ *Department of Clinical Biochemistry, Hematology and Immunology, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic*

Short title: Genetic determinants of folate status in Czechs

Correspondence to Dr. Viktor Kožich, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic; Tel: +420-224967679, Fax: +420-224919392; E-mail: VKOZICH@LF1.CUNI.CZ.

ABSTRACT

Although several genetic factors have been implicated as determinants of blood folate concentration in various populations, their effect on folate status in Czechs has not been examined yet. We explored whether blood folate concentrations in healthy Czech population are associated with polymorphisms in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), folate hydrolase 1 (FOLH1), reduced folate carrier (RFC), folate receptor (FOLR1) genes. In a cross-sectional study of 591 control subjects we determined genotypes by PCR-RFLP or ARMS-PCR methods, and plasma and erythrocyte folates by MEIA. The effect of different genotypes on folate status was examined by nonparametric tests and by regression analysis. The prevalence of the MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C, FOLH1 1561C>T, RFC 80G>A and FOLR1 480G>C variant alleles was 0.34, 0.33, 0.05, 0.44, and 0.00 respectively. Only the MTHFR 677C>T variant was significantly associated with plasma folate concentrations (median 14.7, 14.0 and 12.2 nmol/l for the CC, CT and TT genotypes, respectively). Our study showed that among the five studied allelic variants, only the 677C>T polymorphism in the MTHFR gene is a significant genetic determinant of plasma folate concentrations in Czechs.

KEY WORDS folates, folate hydrolase 1, reduced folate carrier, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, polymorphism

INTRODUCTION

Folates constitute a group of compounds derived from the 5,6,7,8-tetrahydropteroylglutamate, more commonly referred to as tetrahydrofolate. The biological role of folates is to facilitate the metabolism of methionine, serine, glycine, choline and histidine, the biosynthesis of purines and pyrimidines, and the assimilation or oxidation of formate (Shane 1990).

Dietary folates have to pass through a number of physiological and metabolic processes, which convert them into intracellular metabolically active forms (Fowler 2001). Disturbances of folate metabolism are associated with many human diseases such as epithelial cancers, anemia, peripheral neuropathies, cardiovascular disease and pregnancy complications (Eichholzer *et al.* 2001; McDonald *et al.* 2003; Rimm *et al.* 1998; Voutilainen *et al.* 2001).

Folate status is influenced by many exogenous and endogenous factors; the common exogenous factors include diet, smoking, alcohol consumption and drugs, while the endogenous factors include e.g. ethnicity, functional status of bowel and liver, and presence of genetic variants (Ganji and Kafai 2003; Halsted *et al.* 2002; Lindeman *et al.* 2003; Nakano *et al.* 2003). More than twenty genes have been implicated in folate metabolism and transport (Cook 2001). Allelic variants in only a few of these genes have been analyzed in population studies and their effects on folate status have been examined.

Two allelic variants in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene (OMIM 607093, EC 1.5.1.20) have been examined extensively in numerous studies including Czech population (Beneš *et al.* 2001). The MTHFR enzyme catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methyltetrahydrofolate (5-methyl THF), the predominant circulating form of folates (Selhub and Miller 1992). In a variety of populations homozygosity for the 677C>T polymorphism has been associated with low folate levels, and with elevated concentrations of plasma total homocysteine (Frosst *et al.* 1995; Rozen 2001; Van Der Put *et al.* 1995). The 1298A>C MTHFR variant, which was analyzed in part of the population studies, did not substantially influence the folate concentrations (Weisberg *et al.* 1998).

Polymorphisms in the FOLH1 and RFC genes belong to the less frequently studied determinants of folate status. The enzyme folate hydrolase 1 (glutamate carboxypeptidase II; OMIM 600934, EC 3.4.17.21) hydrolyzes terminal glutamate residues in the intestine, playing thus an important role in the absorption of dietary folates (Devlin *et al.* 2000). The carriership of the 1561C>T variant was associated with lower concentrations of plasma folates in one study (Devlin *et al.* 2000) and with higher concentrations in other studies (Vargas-Martinez *et al.* 2002; Winkelmayr *et al.* 2003). The reduced folate carrier, RFC, (OMIM 600424) is an essential folate transporter (Chango *et al.* 2000). Although different genotypes in the RFC 80G>A locus were associated with varying folate concentrations, the effect was not statistically significant in several published studies (Chango *et al.* 2000; Morin *et al.* 2003; Winkelmayr *et al.* 2003).

The folate receptor FOLR1 (OMIM 136430), which is a folate transporter, plays an important role in the embryonic development as demonstrated by numerous malformations in mice with deleted FOLR1 gene (Finnell *et al.* 2002), and by neural tube defects in mice embryos treated by FOLR1 antisense mRNA (Hansen *et al.* 2003). Only one putative polymorphism in this gene, namely 480G>C, has been described in the NCBI SNP database as of January 2003, however, its effect on folate concentrations has not been determined yet.

To examine the effect of the above-mentioned polymorphisms on folate metabolism in Czech population, we analyzed the relationship between five genetic variants (i.e. 1561C>T in FOLH1, 80G>A in RFC, 677C>T and 1298A>C in MTHFR, 480G>C in FOLR1 genes), and plasma or erythrocyte folate concentrations in 591 healthy Czech controls. Based on these analyses, we hypothesize on the possible effect of these genetic factors on folate status in Czech.

METHODS

Subjects

For the analyses of genotypes and folates we used blood samples obtained from 591 healthy controls, who were recruited in a previously described study (Janošíková *et al.* 2003). The study exclusion criteria were as follows: age below 18 and above 65, domicile out of central Bohemia or Prague, lactation, pregnancy, history of stroke or psychiatric disorders, presence of malignancies or of any symptoms of atherosclerosis. The history of smoking, consumption of beer and other alcoholic beverages, vegetables/fruit consumption, caloric restriction and vitamin use was obtained by questionnaire. One hundred-sixty two subjects used different multivitamins regularly (and of which 80 used multivitamins containing folates); these subjects stopped vitamin intake one week before blood drawing. The study was approved by Ethics Committee of Charles University-1st Faculty of Medicine; all subjects gave their written informed consent.

Laboratory analyses

Blood was drawn by standard venostasis, using EDTA as anticoagulant. For determination of erythrocyte folates, 0.2 ml of blood were immediately mixed with 4 ml of 1% ascorbic acid, left at room temperature for 90 minutes and frozen at -20°C prior to the analysis. Plasma was obtained by centrifugation at 2000 g for 15 minutes at 4°C. Erythrocyte and plasma folates, vitamin B₁₂ and B₆ (pyridoxal 5' phosphate) were determined by AxSYM Folate assay, AxSYM B₁₂ assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) and Reagent kit for HPLC analysis of pyridoxal 5' phosphate in plasma/serum and whole blood (Chromsystems, Munchen, Germany), respectively. Concentrations of aminothiols homocysteine (Hcy), cysteine (Cys), and glutathione (GSH) were determined by the HPLC method using tris(2-carboxyl-ethyl)phosphine as a reductant of disulphide bonds, and ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate as a fluorescent derivatization agent (Krijt *et al.* 2001). Genomic DNA was isolated from whole blood using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). The methods of analysis for 677C>T and 1298A>C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene by ARMS-PCR were published previously (Janošíková *et al.* 2003). The 80G>A in the reduced folate carrier gene was examined by PCR with allele specific primer pairs (forward primer, 5'-GGGAGGCCTGCAGACCATC-3'; reverse primer, 5'-AGCAAAGGTAGCACACGACGC-3' for wild type allele, and 5'-AGCAAAGGTAGCACACGACGT-3' for the variant allele, respectively). The polymorphism 1561C>T in folate hydrolase 1 gene was analyzed by PCR-RFLP method as described previously (Devlin *et al.* 2000). The polymorphism 480 G>C in FOLR1 gene was detected by PCR-RFLP using a forward primer 5'- CCCCTGTGCAAAGAGGACTGT -3' and a reverse primer 5'- CCCACTGCGCACTTGTAAAC -3'. The 268 bp PCR product was digested by HpyCH4V; the presence of a control restriction site formed a 210 bp product from the normal allele while the mutant allele was digested to 186 and 24 bp products. All PCR products were analyzed by electrophoresis in 3% agarose gels stained with ethidium bromide. Detailed protocols can be requested from the authors.

Statistical analysis

The proportions were tested using exact binomial test, and continuous variables were compared by Mann-Whitney nonparametric test. Plasma and blood folate levels were logarithmically transformed where appropriate; one subject with extremely low erythrocyte and normal plasma folate concentrations was excluded from selected statistical analyses due to possible laboratory error (the sample was not available for repeated analyses). To assess the relationship between the folate levels and gene variants we employed two different approaches: (1) linear regression of logarithm of folate levels with assumption of dose-

response effect of variant allele, and (2) Mann-Whitney test comparing folate levels of subjects with at least one wild type allele to variant homozygotes. The first approach was complemented by multiple regression allowing for confounding variables (gender, age, smoking, consumption of beer and other alcoholic beverages, vegetables/fruit consumption, caloric restriction). All statistical analyses were performed at 5% level of statistical significance using S+, version 6.0 and R, version 1.6.1.

RESULTS

Of the 591 subjects, one fifth used various types of multivitamins regularly, only eighty individuals used multivitamins containing both folates and vitamin B6 (for the latter group median intake of vitamins B₆, B₁₂, and of folate in multivitamin preparations was 2 mg, 6 µg and 400 µg, respectively). These 80 subjects taking folates and vitamin B6 in multivitamins are further referred to as folate users. The folate users had significantly higher levels of plasma and erythrocyte folate, and of plasma vitamin B6 than the folate non-users (16.8 nmol/l, 797 nmol/l and 11.4 µmol/l vs. 14, 716 and 9.7, respectively). Congruently, the folate users showed lower plasma homocysteine levels.

The role of genetic variants of folate status was assessed in the subset of 511 folate non-users, who did not differ in demographic characteristics from the folate users (see Table 2). The distribution of genotypes and variant allele frequencies in study group is presented in Table 3. The prevalence of the MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C, FOLH1 1561C>T and RFC 80G>A variants in the Czech population was similar to that described in other Caucasians populations (Brattstrom *et al.* 1998; Devlin *et al.* 2000; Chango *et al.* 2000; Klerk *et al.* 2002; Van Der Put *et al.* 1998) and in Czechs (Beneš *et al.* 2001). The putative 480G>C variant in the FOLR1 gene was not found at any of the 100 examined control chromosomes and was not further explored in the whole set.

To assess the relationship between plasma/blood folate levels and the four studied polymorphisms in the population of folate non-users, we employed two different statistical approaches: (1) a test for linear trend assuming a dose-response effect of the studied alleles, and (2) a test for comparison between the group of homozygotes for the variant allele and the group of heterozygotes pooled with the wild type homozygotes, assuming a recessive effect of the variant allele. The relevant statistical methods are described in Methods, the results are summarized in Table 4. The two methods agreed that there was no statistically significant effect of folate hydrolase 1, reduced folate carrier and MTHFR 1298A>C variants on plasma and blood folate levels.

In contrast, the carriership of the MTHFR 677C>T variant was associated with a significant decrease of plasma folate levels. The median plasma folates in subjects with the CC, CT and TT genotypes were 14.7, 14.0 and 12.2 nmol/l, respectively, showing a significant linear trend with the increasing number of variant alleles. The multiple linear regression analysis revealed four additional major determinants of folate status, namely gender, beer consumption, caloric restriction and plasma levels of vitamin B₁₂ (data not shown). However, their addition to the model did not attenuate the effect of the MTHFR 677C>T variant confirming that the MTHFR variant is indeed a significant independent determinant of folate status. In contrast to plasma, the erythrocyte folate concentrations increased significantly with the increasing number of MTHFR 677C>T variant alleles. The median erythrocyte folate levels were substantially higher in TT homozygotes than in the other two genotypes (867 vs. 703 nmol/l, respectively) and there was also a significant linear trend for the three genotypes. In summary, our analyses of five SNPs show that only carriership of the 677C>T variant is associated with a significant effect on folate status in Czech populations, namely with decreased levels of plasma folate.

DISCUSSION

In this study we analyzed whether allelic variants in four genes of folate metabolism are determinants of plasma and erythrocyte folate levels in a homogenous Czech population. This population was especially suitable for analyzing the genetic component of folate status owing to the absence of a national food fortification program and relatively low consumption of vitamin supplements compared to other populations (Ganji and Kafai 2003). Our findings in Czech controls correspond to the previous publications (Ashfield-Watt *et al.* 2002; Van Der Put *et al.* 1998; Van Der Put *et al.* 1995), which showed that TT homozygotes for MTHFR 677C>T polymorphism exhibited lower plasma concentrations of folates than the wild type homozygotes.

Although the TT homozygosity was associated with decreased erythrocyte folate levels in many studies, several publications reported their increase (Nelen *et al.* 1998; Van Der Put *et al.* 1995). The incongruous effect of TT homozygosity on erythrocyte folate concentrations may result from different analytical methods used in the published reports. Increased erythrocyte folates were reported in several studies, which employed the same MEIA method as used in our study. It is conceivable that the increased proportion of formylated erythrocyte folates in TT homozygotes (Bagley and Selhub 1998) may have led to the overestimation of total erythrocyte folates by the MEIA method (Molloy *et al.* 1998).

For practical reasons, a crucial question should be answered: namely, whether the effect of MTHFR 677 T variant on plasma folates may be reversed by supplementing low doses of folic acid in diet or vitamins. Average dietary intake of folates in Czech population is 197 µg per day (Ruprich 1997), which is similar to e.g. Netherlands (De Bree *et al.* 2003). Food fortification may increase the intake by 215-240 µg/day to approximately 400 µg per day (Quinlivan and Gregory 2003), a dose usually contained in multivitamins. Our cohort of 80 folate users contained only 8 homozygotes for TT variant; owing to the low power we did not evaluate the effect of folates for individual genotypes. Data from other studies, however, demonstrated that carriers of mutant allele compared to CC individuals benefit less from vitamins supplements of 400 µg folates per day, or from increased dietary folate intake (De Bree *et al.* 2003). Taken together, the low dose folic acid supplements in multivitamins or in fortified food may not be sufficient for a large segment of Caucasian populations, namely for the TT homozygotes.

The other analyzed genetic variants (i.e. MTHFR 1298A>C, FOLH1 1561C>T and RFC 80G>A) were not significantly associated with blood or plasma folate levels, which corresponds to several previously published studies (Devlin *et al.* 2000; Fodinger *et al.* 2003; Chango *et al.* 2000). It is also important to note that the 1561C>T variant in the folate hydrolase 1 gene may have effect on folate status, however, the low frequency of the variant allele requires larger samples to detect any statistically significant association. In summary, it seems that except for the MTHFR 677C>T variant the other important genetic determinants of folate status, if any, have not been found yet.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. A. Vítová and L. Krupková, Bc. for recruiting the original cohort for the study, Ms. E. Richterová and Ms. M. Boučková for their excellent technical assistance. This project was supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NM-6548 and NA 6497, and in part by the research project of the Charles University-1st Faculty of Medicine, No. MSM 111100003.

REFERENCES

- ASHFIELD-WATT PA, PULLIN CH, WHITING JM, CLARK ZE, MOAT SJ, NEWCOMBE RG, BURR ML, LEWIS MJ, POWERS HJ, MCDOWELL IF: Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* **76**: 180-6, 2002.
- BAGLEY PJ, SELHUB J: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13217-20, 1998.
- BENEŠ P, KAŇKOVÁ K, MUŽÍK J, GROCH L, BENEDÍK J, ELBL L, IZAKOVIČOVÁ-HOLLA L, VAŠKŮ A, ZNOJIL V, VÁCHA J: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, type II diabetes mellitus, coronary artery disease, and essential hypertension in the Czech population. *Mol Genet Metab* **73**: 188-95, 2001.
- BRATTSTROM L, WILCKEN DE, OHRVIK J, BRUDIN L: Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* **98**: 2520-6, 1998.
- COOK RJ: Folate Metabolism. In: *Homocysteine in Health and Disease*. R CARMEL, DW JACOBSEN (eds), Cambridge University Press, Cambridge, 2001, pp 113-134.
- DE BREE A, VERSCHUREN WM, BJORKE-MONSEN AL, VAN DER PUT NM, HEIL SG, TRIJBELS FJ, BLOM HJ: Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* **77**: 687-93, 2003.
- DEVLIN AM, LING EH, PEERSON JM, FERNANDO S, CLARKE R, SMITH AD, HALSTED CH: Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Hum Mol Genet* **9**: 2837-44, 2000.
- EICHHOLZER M, LUTHY J, MOSER U, FOWLER B: Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med Wkly* **131**: 539-49, 2001.
- FINNELL RH, SPIEGELSTEIN O, WLODARCZYK B, TRIPLETT A, POGRIBNY IP, MELNYK S, JAMES JS: DNA methylation in Folbp1 knockout mice supplemented with folic acid during gestation. *J Nutr* **132**: 2457S-2461S, 2002.
- FODINGER M, DIERKES J, SKOUPY S, ROHRER C, HAGEN W, PUTTINGER H, HAUSER AC, VYCHYTIL A, SUNDER-PLOSSMANN G: Effect of glutamate carboxypeptidase II and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1314-9, 2003.
- FOWLER B: The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int Suppl* **78**: S221-9, 2001.
- FROSST P, BLOM HJ, MILOS R, GOYETTE P, SHEPPARD CA, MATTHEWS RG, BOERS GJ, DEN HEIJER M, KLUIJTMANS LA, VAN DEN HEUVEL LP, ET AL.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10**: 111-3, 1995.
- GANJI V, KAFAI MR: Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* **77**: 826-33, 2003.
- HALSTED CH, VILLANUEVA JA, DEVLIN AM, CHANDLER CJ: Metabolic interactions of alcohol and folate. *J Nutr* **132**: 2367S-2372S, 2002.
- HANSEN DK, STRECK RD, ANTONY AC: Antisense modulation of the coding or regulatory sequence of the folate receptor (folate binding protein-1) in mouse embryos leads to neural tube defects. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* **67**: 475-87, 2003.
- CHANGO A, EMERY-FILLON N, DE COURCY GP, LAMBERT D, PFISTER M, ROSENBLATT DS, NICOLAS JP: A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* **70**: 310-5, 2000.
- JANOŠÍKOVÁ B, PAVLÍKOVÁ M, KOČMANOVÁ D, VÍTOVÁ A, VESELÁ K, KRUPKOVÁ L, KAHLEOVÁ R, KRIJIT J, KRAML P, HYÁNEK J, ZVÁROVÁ J, ANDĚL M, KOŽICH V: Genetic

- variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab* **79**: 167-175, 2003.
- KLERK M, VERHOEF P, CLARKE R, BLOM HJ, KOK FJ, SCHOUTEN EG: MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Jama* **288**: 2023-31, 2002.
- KRIJT J, VACKOVÁ M, KOŽICH V: Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clin Chem* **47**: 1821-8, 2001.
- LINDEMAN RD, ROMERO LJ, YAU CL, KOEHLER KM, BAUMGARTNER RN, GARRY PJ: Serum homocysteine concentrations and their relation to serum folate and vitamin B12 concentrations and coronary artery disease prevalence in an urban, bi-ethnic community. *Ethn Dis* **13**: 178-85, 2003.
- MCDONALD SD, FERGUSON S, TAM L, LOUGHEED J, WALKER MC: The prevention of congenital anomalies with periconceptional folic acid supplementation. *J Obstet Gynaecol Can* **25**: 115-21, 2003.
- MOLLOY AM, MILLS JL, KIRKE PN, WHITEHEAD AS, WEIR DG, SCOTT JM: Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. *Clin Chem* **44**: 186-8, 1998.
- MORIN I, DEVLIN AM, LECLERC D, SABBAGHIAN N, HALSTED CH, FINNELL R, ROZEN R: Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab* **79**: 197-200, 2003.
- NAKANO E, TAYLOR CJ, CHADA L, MCGAW J, POWERS HJ: Hyperhomocystinemia in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **37**: 586-90, 2003.
- NELEN WL, BLOM HJ, THOMAS CM, STEEGERS EA, BOERS GH, ESKES TK: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* **128**: 1336-41, 1998.
- QUINLIVAN EP, GREGORY JF: Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* **77**: 221-5, 2003.
- RIMM EB, WILLETT WC, HU FB, SAMPSON L, COLDITZ GA, MANSON JE, HENNEKENS C, STAMPFER MJ: Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *Jama* **279**: 359-64, 1998.
- ROZEN R: Polymorphisms of Folate and Cobalamin Metabolism. In: *Homocysteine in Health and Disease*. DWJ RALPH CARMEL (eds), Cambridge University Press, Cambridge, 2001, pp 259-269.
- RUPRICH J: Kyselina listová. In: *Spotřební koš potravin pro ČR*. J RUPRICH (eds), Státní zdravotní ústav, Praha, 1997, pp 52-61.
- SELHUB J, MILLER JW: The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* **55**: 131-8, 1992.
- SHANE B: Folate metabolism. In: *Folic acid metabolism in health and disease*. M PICCIANO, E STOKSTAD, J GREGORY (eds), Wiley-Liss, Inc., New York, 1990, pp 65-78.
- VAN DER PUT NM, GABREELS F, STEVENS EM, SMEITINK JA, TRIJBELS FJ, ESKES TK, VAN DEN HEUVEL LP, BLOM HJ: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* **62**: 1044-51, 1998.
- VAN DER PUT NM, STEEGERS-THEUNISSEN RP, FROSST P, TRIJBELS FJ, ESKES TK, VAN DEN HEUVEL LP, MARIMAN EC, DEN HEYER M, ROZEN R, BLOM HJ: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* **346**: 1070-1, 1995.
- VARGAS-MARTINEZ C, ORDOVAS JM, WILSON PW, SELHUB J: The glutamate carboxypeptidase gene II (C>T) polymorphism does not affect folate status in the Framingham Offspring cohort. *J Nutr* **132**: 1176-9, 2002.
- VOUTILAINEN S, RISSANEN TH, VIRTANEN J, LAKKA TA, SALONEN JT: Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* **103**: 2674-80, 2001.
- WEISBERG I, TRAN P, CHRISTENSEN B, SIBANI S, ROZEN R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* **64**: 169-72, 1998.
- WINKELMAYER WC, EBERLE C, SUNDER-PLASSMANN G, FODINGER M: Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int* **63**: 2280-5, 2003.

Table 1. Aminothiol and vitamin concentrations in studied subjects

	Fasting concentrations		Concentrations 6 h after the methionine load	
	Folate non-users	Folate users	Folate non-users	Folate users
		(n=80)	(n=511)	(n=80)
	(n=511)			
Plasma tHcy, $\mu\text{mol/l}$	9.6 (8.2;11.3)	9.0 (7.4;10.8)	35.4 (29.9;43.1)	33.2 (27.6;41.1)
Plasma tCys, $\mu\text{mol/l}$	299 (272;328)	302 (282;322)	279 (252;307)	279 (264;296)
Blood fGSH, $\mu\text{mol/l}$	974 (759;1197)	974 (827;1149)	995 (744;1173)	1028 (856;1132)
Plasma folates, nmol/l	14 (10.6;17.7)	16.8 (12.8;25.3)	0.0000	0.0165
Erythrocyte folates, nmol/l	716 (587;907)	797 (703;990)	0.0003	0.5634
Plasma vitamin B ₆ , $\mu\text{mol/l}$	9.7 (6.6;13.2)	11.4 (7;17.7)	0.0235	0.4574
Plasma vitamin B ₁₂ , $\mu\text{mol/l}$	278 (215;364)	286 (219;338)	0.6650	

Data are presented as medians and 1st and 3rd quartile in parentheses. p[†]-value belongs to Mann-Whitney test for differences in medians between folate users and folate non-users populations.

tHcy, total homocysteine; tCys, total cysteine; fGSH, non-protein bound (free) glutathione

Table 2. Characteristics of studied subjects

	Non- folate users	Folate users	All controls
Number of individuals	511	80	591
Males, %	47	59	48
Age, median, years	49 (42;55)	51 (45.5;54.25)	50 (42;55)
WHR, median, m/m	0.84 (0.80;0.90)	0.87 (0.80;0.90)	0.85 (0.80;0.91)
BMI, median, kg/m ²	25.9 (23.3;28.3)	26.1 (23.8;28.4)	25.9 (23.4;28.4)
Smoking status, current+former, %	43 (38;47)	39 (28;50)	42 (38;46)
Smoking [†] , median, packyears	4109 (1575;7670)	5479 (2466;9177)	4200 (1650;7950)
Abstinent, %	32 (28;36)	24 (15;35)	31 (27;35)
Alcohol consumption [‡] , median, g/week	84 (40;187.5)	100 (55;184)	95 (40;187.5)
Hyperlipidemia, %	24 (20;28)	29 (19;40)	24 (21;28)
Hypertension, %	13 (11;17)	14 (7;24)	13 (11;16)
Diabetes mellitus, %	4 (2;6)	6 (2;15)	4 (3;6)

Data are presented as medians with 1st and 3rd quartile or proportions with 95% CI in parentheses.

Appropriate statistical tests were all non-significant at 5% significance level.

A diagnosis of hypertension, diabetes mellitus, or hyperlipidemia was defined as receiving current treatment for or having a past history of the condition.

WHR, waist/hip ratio; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; [†] current and former smokers only; [‡] non-abstinent only

Table 3. Prevalence of genotypes and alleles in folate non-users and folate users population

Allelic variant	Folate non-users population (n=511)				Folate users (n=80)			
	Observed genotypes		f		Observed genotypes		f	
	W/W	W/M	M/M	95%CI	W/W	W/M	M/M	95%CI
MTHFR c.677C>T								
A222V	211	248	51	0.34 (0.31-0.37)	34	38	8	0.34 (0.26-0.42)
MTHFR c.1298A>C								
E429E	226	235	50	0.33 (0.30-0.36)	38	33	9	0.32 (0.25-0.40)
RFC c.80G>A								
H27R	156	263	92	0.44 (0.41-0.47)	22	36	22	0.5 (0.42-0.58)
FOLH1 c.1561C>T								
H475Y	465	44	2	0.05 (0.03-0.06)	67	12	0	0.08 (0.04-0.13)
FOLR1 c.480G>C*								
W160C	50	0	0					

Data presented as numbers of individuals with the respective genotype (W, wild type allele; M, variant type allele); f, prevalence of the rare allele in the respective group with 95%CI given in parentheses.

*tested on 50 individuals (100 alleles) only

All alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium among both control set and its folate non-users subset.

MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase; RFC, reduced folate carrier; FOLH1, folate hydrolase 1; FOLR1, folate receptor

Table 4. Plasma and blood folate levels in folate non-users population

Median of plasma folate		Observed genotypes				linear trend	W/W + W/M	M/M	p
Allelic variant	n	W/W	W/M	M/M	linear trend	W/W + W/M	M/M	Mann-Whitney	
MTHFR c.677C>T A222V	510	14.7	14.0	12.2	0.0422	14.3	12.2	0.0735	
MTHFR c.1298A>C E429E	511	14.0	13.8	15.1	0.7542	13.9	15.1	0.2329	
RFC c.80G>A H27R	511	14.8	13.8	13.4	0.4032	14.1	13.4	0.4916	
FOLH1 c.1561C>T W160C [†]	511	13.8	15.4	17.3	0.3780	13.8	15.4	0.256 [‡]	

Median of blood folate		Observed genotypes				linear trend	W/W + W/M	M/M	p
Allelic variant	n	W/W	W/M	M/M	linear trend	W/W + W/M	M/M	Mann-Whitney	
MTHFR c.677C>T A222V	510	710	700	876	0.0337	703	876	0.0000	
MTHFR c.1298A>C E429E	511	715	716	757	0.7079	716	757	0.9552	
RFC c.80G>A H27R	511	711	734	690	0.5961	722	690	0.5225	
FOLH1 c.1561C>T W160C [†]	511	718	712	1019	0.6547	718	712	0.7012 [‡]	

Legend:

W, wild-type allele; M, variant-type allele

[†] Only two observations for variant homozygotes

[‡] Comparison made between the group of wild type homozygotes and the group of heterozygotes and variant homozygotes together

3.3.5

Plasma Cysteine Concentrations in Uncomplicated Pregnancies

Fetal Dian Ther., 2007

1. Title page

Plasma cysteine concentrations in uncomplicated pregnancies

Viskova H¹, Vesela K², Janosikova B², Krijt J², Visek JA³, Calda P¹

1 Department of Obstetrics and Gynaecology, Charles University, 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

2 Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University, 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

3 Faculty of Social Sciences, Charles University, Prague, Czech Republic

Author responsible for manuscript preparation: **Hana Viskova, M.D.**

Department of Obstetrics and Gynaecology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and the General Faculty Hospital, Apolinarska 18, Prague 2, 120 00, Czech Republic.

Tel.: +420 (2) 24967273

e-mail: hanaviskova@seznam.cz

2. Text

KEY WORDS

Plasma total cysteine, Pregnancy, Pre-eclampsia

ABSTRACT

Objective: To measure levels of total plasma cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione of normotensive primiparous pregnant women in the second and the third trimester.

Methods: Two consecutive blood samples were taken from 65 healthy primiparous women, in the 19th to 21st week of pregnancy and then in the 30th to 32nd weeks. Plasma total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione were determined by HPLC method. Women were followed until delivery. Sixty-two pregnant women were normotensive throughout the pregnancy and 3 developed pre-eclampsia. Median levels of thiols in the second and the third trimester were compared using paired t-test.

Results: Levels (median [range], $\mu\text{mol/L}$) of plasma total cysteine in normotensive pregnant women were significantly lower in the third than in the mid trimester (176.1 [163.0, 189.4] versus 187.4 [178.7, 205.2], $P < 0.001$). Concentrations of total homocysteine, cysteinylglycine and glutathione were not different.

Conclusion: Plasma total cysteine (t-Cys) is significantly lower in the third compared to the second trimester. Urinary excretion of t-Cys does not differ in the second compared to the third trimester. The decrease of t-Cys might indicate that cysteine is essential for the fetus.

INTRODUCTION

Methionine, the only essential sulphur amino acid in the mammalian diet [1], is important to intermediate metabolism. The most important metabolic roles of methionine include synthesis of S-adenosylmethionine, the primary biological donor of methyl groups; and synthesis of homocysteine. Homocysteine is either remethylated back to methionine in the remethylation pathway or directed to the transsulfuration pathway in which homocysteine is irreversibly converted to cysteine. Cysteine is an intermediary product of methionine metabolism (Fig. 1), one of three amino acids contained in glutathione, which plays an important role in detoxification processes and in scavenging free radicals. Methionine metabolism is closely related to the folate cycle.

Hundreds of studies have been published about homocysteine in pregnancy, but less is known about cysteine. Maternal plasma total homocysteine (t-Hcy) is significantly decreased in normal pregnancy compared to the non-pregnant state [2]. On the other hand, published studies demonstrate an association between increased plasma levels of homocysteine and several obstetric complications such as pre-eclampsia [3,4,5,6,7], intrauterine growth retardation (IUGR), placental abruption [8], spontaneous miscarriage, neural tube defects (NTD) [9] and other pregnancy complications [10]. Published studies also demonstrate lower plasma total cysteine (t-Cys) in pregnant than in non-pregnant women and higher plasma t-Cys in pre-eclamptic women than in those with normal pregnancies [4,7]. Both those studies had cross-sectional designs and it is not known whether elevated t-Cys is the result of established pre-eclampsia or whether the elevation is already present before development of clinical and laboratory signs of pre-eclampsia.

The aim of our study was to describe normal levels of plasma total cysteine and other amino thiols in the second and the third trimesters of physiologic pregnancy.

SUBJECTS AND METHODS

Study design

This study was designed as prospective and observational. Study subjects were pregnant women coming for screening anomaly scan in the 19th to 21st week of pregnancy to the Department of Obstetrics and Gynaecology of the 1st Faculty of Medicine of Charles University, Prague. History was taken by structured questionnaire (personal and family history, vitamin and folate supplementation, consumption of alcohol, smoking). Inclusion criteria were: primigravida, with singleton pregnancy. Exclusion criteria were: primary or pregnancy induced hypertension, diabetes mellitus, renal disease, abnormal anomaly scan and family history of pre-eclampsia. Patients referred to our centre for any reason were excluded as well. A non-fasting blood sample was taken and the woman was asked to return in the 30th to 32nd week of pregnancy for the second scan and blood sampling. Sixty- five consecutively presenting pregnant women met inclusion criteria and had both blood samplings between January 2002 and September 2003. Women were followed up until labour. Sixty-two pregnant women were normotensive throughout the pregnancy and 3 developed pre-eclampsia. The clinical characteristics of 62 healthy pregnant women are shown in Table 1.

Pre-eclampsia was defined, according to the standards of the International Society for the study of Hypertension in Pregnancy, as hypertension developing in the second half of pregnancy (diastolic blood pressure above 90 on at least two consecutive occasions, each more than 4 hours apart), with proteinuria.

The study was approved by Ethics Committee of the 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. All subjects gave their written informed consent.

Laboratory analyses

Blood was drawn by standard venipuncture using EDTA tubes. The blood sample for aminothiols analysis was chilled immediately in an ice water bath. Plasma was obtained by centrifugation at 2000 g for 15 minutes at 4°C within 15 minutes after sampling. All plasma samples were immediately frozen at -80°C prior to the analysis. Concentrations of plasma total cysteine (t-Cys), homocysteine (t-Hcy), cysteinylglycine (t-Cys-Gly) and glutathione (GSH) were determined by the HPLC method using tris(2-carboxyl-ethyl)phosphine as a reductant of disulphide bonds, and ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate as a fluorescent derivatization agent as previously described [11].

Statistics

The data were analyzed using STATISTICA (99 edition) software. For analyses of aminothiol levels in pregnant women in the 20th versus the 30th week of pregnancy the *t*-test for dependent samples with separate variance estimate was used. Analysis of correlation of t-Cys and haematocrit was done by correlation matrix. The statistical significance level was set to 0.05.

RESULTS

Median values of plasma total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione in the 19th-21st (the mid trimester) and 30th-32nd (the third trimester) week of pregnancy were determined for 62 healthy pregnant women (Table 2). Plasma values of total cysteine were significantly lower in the third (176.1 μmol/L) than in the mid trimester (187.4 μmol/L) ($p < 0.001$). Concentrations of total homocysteine, cysteinylglycine and glutathione were not different.

We examined possible explanations of the observed decrease of plasma t-Cys. Because plasma total homocysteine levels correlate with haematocrit [1], we tested whether

such a relationship existed for cysteine and whether it may have caused the decrease of t-Cys level in the third trimester. We did not observe any correlation between plasma t-Cys and haematocrit either in the mid trimester or the third trimester, respectively.

All 3 cases of pre-eclampsia manifested close to term, in the 38th to 41st week of pregnancy, labor was induced, and healthy newborns without intrauterine growth retardation (IUGR) were born. Except for the high blood pressure and proteinuria, there was no other complication in mothers. The Tab 3 shows values of plasma t-Cys of 3 women with subsequent pre-eclampsia and Fig. 2 shows those values interpolated on a quartile graph plasma t-Cys in healthy pregnancies. In the mid trimester, levels of t-Cys in women who subsequently developed pre-eclampsia were spread through a whole interval. In the third trimester, values of all pre-eclamptic women were in the upper quartile.

DISCUSSION

Maternal plasma total homocysteine (t-Hcy) is significantly decreased in normal pregnancy compared to the non-pregnant state [2]. High concentrations of plasma t-Hcy are associated with serious pregnancy complications such as pre-eclampsia [3,4,5,6,7], intrauterine growth retardation (IUGR), placental abruption [8], spontaneous miscarriage and neural tube defects (NTD) [9]. Cysteine has similar structural and chemical properties to those of homocysteine, but so far the relation between plasma t-Cys and pregnancy complications has received little attention. Maternal plasma t-Cys have been studied only in studies with cross-sectional designs [4,7]. Those studies demonstrated lower plasma t-Cys in pregnant women than in non-pregnant ones and higher plasma t-Cys concentration in preeclamptic women than in women without preeclampsia [4]. In the Hordaland Homocysteine study plasma t-Cys concentrations of almost six thousand women aged 40-42 years were compared with the outcomes and complications of more than fourteen thousand pregnancies in the same

women [10]. The relation between plasma t-Cys and pregnancy complications and adverse pregnancy outcomes were much weaker than that found for plasma t-Hcy. Nevertheless, when a combination of variable of plasma t-Cys and t-Hcy was investigated, the results showed that t-Hcy concentration is a risk factor for pre-eclampsia, premature delivery or low birth weight only if both plasma t-Hcy and plasma t-Cys concentration are elevated [10]. Thus, the possibility of interaction between cysteine and homocysteine in the pathogenesis of pregnancy complications cannot be ruled out.

In our study we showed that plasma total cysteine levels decline between the mid and the third trimester in uncomplicated pregnancies. The reason for this decrease is not clear.

According to our data, the decrease of plasma t-Cys cannot be explained by the change of haematocrit; not only because plasma t-Cys does not correlate with haematocrit, but also because haematocrit did not change significantly between the mid and the third trimesters.

We hypothesize, that decline of plasma t-Cys might be caused by higher urinary excretion of cysteine in the 30th week compared to the 20th week of pregnancy, or by increased consumption of cysteine by the fetus. To test the hypothesis of higher urinary excretion we used data from a small, separate study. In that study 40 urinary samples were tested: 20 samples from pregnant women in the 19th-21st week of pregnancy and 20 samples from pregnant women in the 30th-32nd week of pregnancy. Pregnant and nonpregnant groups of women in that separate study matched the same clinical characteristics as 62 pregnant women (Tab 1). The difference of total cysteine levels in urine normalized on creatinine concentration were analyzed by a non-paired t-test. There was no statistically significant difference in urinary excretion of cysteine between the mid and the third trimester ($p=0.35$, data not shown). Although the number of observations is quite small, the data do not support the hypothesis that fall of plasma t-Cys between the mid and third trimesters is caused by higher urinary excretion of cysteine. Additionally we tested 20 samples from non-pregnant

women and determined total cysteine levels in urine normalized on creatinine concentration, then analyzed the difference between urine of pregnant women and nonpregnant women by a non-paired t-test. The difference between urinary excretion of cysteine in non-pregnant women and urinary excretion of cysteine in those in the 20th week and the 30th week of pregnancy, respectively, was significant ($p < 0.05$). Data from this small study group support the hypothesis, that lower plasma total cysteine in pregnant compared to non-pregnant women might be caused by higher urinary excretion in those who are pregnant. This would be in accordance with observations of Powers et al. [12]. They determined higher urinary excretion of homocysteine in pregnancy and significant inverse correlation between plasma t-Hcy and the renal clearance of homocysteine. The change in renal handling of cysteine during pregnancy may be similar because cysteine, like homocysteine, is filtered by the kidney and then reabsorbed in the proximal tubule by an identical transporter [12].

Another cause of decrease in plasma t-Cys between the mid and the third trimester might be increased consumption of cysteine by the fetus. Although there is growing information about regulation of metabolism of sulphur amino acids and transsulphuration in adults, little is known about the early embryonic and fetal development of these pathways. Ahola et al [13] published a study of thiol metabolism (especially cysteine and glutathione metabolism) in preterm infants. They hypothesized, that in presence of oxidative stress, synthesis of glutathione might not be adequate in preterm neonates because of low levels of available cysteine. They found an initial increase in plasma glutathione and initial decrease in plasma cysteine during the first week of neonatal life. The correlation between erythrocyte cysteine and glutathione levels was positive. We hypothesize, that the decrease of maternal plasma total cysteine during pregnancy might be caused by immaturity of fetal methionine transformation into cysteine and its products (taurine and glutathione), which makes cysteine

essential or semi-essential for fetus. Additional studies are needed, however, to confirm this hypothesis.

Cysteine, an intermediary product of the irreversible transulphuration pathway of homocysteine degradation, has the ability to autooxidize (i.e. produce peroxide and free radicals). Consequently cysteine may play a role in eliciting oxidative stress, currently considered an important pathophysiologic factor in the development of pre-eclampsia [14,15]. The number of pre-eclampsia cases in our study group was too small for statistical analysis; nevertheless we attempted to evaluate the data (Tab 3, Fig. 2). The Fig. 2 shows interpolated values of plasma t-Cys of 3 women with pre-eclampsia on a quartile graph plasma t-Cys in healthy pregnancies. In the mid trimester, levels of t-Cys in women who subsequently developed pre-eclampsia were spread through a whole interval. In the third trimester, values of all pre-eclamptic women were in the upper quartile. We hypothesize that the rise of plasma total cysteine (or improper fall, respectively) may precede clinical signs of pre-eclampsia. For verification of this hypothesis and evaluation of t-Cys as a potential early laboratory marker of pre-eclampsia, additional studies with sufficient power would be necessary.

Contract grant sponsor: Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic, grant contract number NM 6548. Research project of Charles University-First Faculty of Medicine grant contract number MSM 0021620806.

REFERENCES

- 1) Heinecke JW: Unique Aspects of Sulphur Chemistry: Homocysteine and Lipid oxidation. In: Carmel R, Jacobsen DW, editors, Homocysteine in Health and Disease. Cambridge: Cambridge University Press. 2001:32-39.
- 2) Anderson A, Hultberg B, Barttstrom L, Isaksson A: Decrease serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:377-9.
- 3) Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jacobs C, van Geijn HP: Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1042-8.
- 4) Rainmakers MTM, Zusterzeel PLM, Steegers EAP, Hectors MPC, Demacker PNM, Peters WHM: Plasma Thiol Status in Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;95:180-184.
- 5) Lopez-Quesada E, Vilaseca MA, Lailla JM: Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *Eu J Obstet Gynecol Repr Biol* 2003;108:45-49.
- 6) Hietala R, Turpeinen U, Laatikainen T: Serum homocysteine at 16 weeks and subsequent preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:527-9.
- 7) Rajmakers MTM, Zusterzeel PLM, Roes EM, Steegers EAP, Mulder TPJ, Peters WHM: Oxidized and free whole blood thiols in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:272-276.
- 8) Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijgroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK: Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;66:23-9.
- 9) Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK: Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 1994;43:1475-80.
- 10) El-Khairi L, Vollset ES, Refsum H, Ueland PM: Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2003;77:467-72.
- 11) Krijt J, Vackova M, Kozich V: Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clin Chem* 2001;47:1821-1828.
- 12) Powers RW, Majors AK, Kerchner LJ, Conrad KP: Renal handling of homocysteine during normal pregnancy and preeclampsia. *J soc Gynecol Investig* 2004;11:45-50.
- 13) Ahola T., Levonen AL, Fellman V, Lapatto R.: Thiol metabolism in preterm infants during the first week of life. *Scan J Clin Lab Invest* 2004;64:649-58.
- 14) Hubel CA: Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:222-235.
- 15) Davidge ST: Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:65-73.

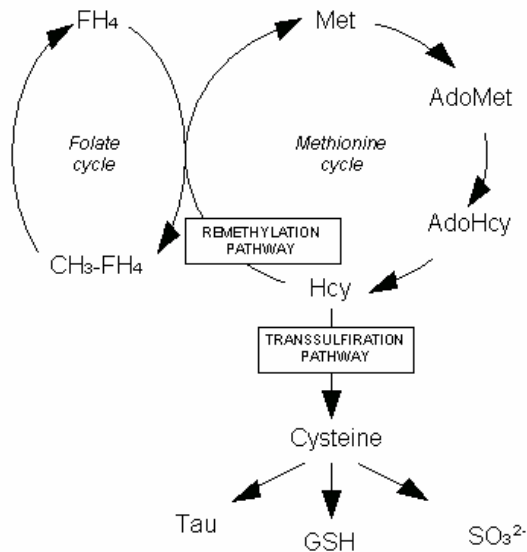


Figure 1 Metabolism of cysteine. Methionine (**Met**) is converted to S-adenosylmethionine (**AdoMet**), the donor of methyl groups and intermediate in synthesis of spermidine and spermine; and after demethylation to S-adenosylhomocysteine (**AdoHcy**) and hydrolysis homocysteine (**Hcy**) is produced. Homocysteine is then either catabolised into cystathionine and cysteine in the *transsulfuration pathway*, or converted back to methionine in the *remethylation pathway*, which is closely related to folate cycle; methyltetrahydrofolate (**CH₃-FH₄**), tetrahydrofolate (**FH₄**). Cysteine is either incorporated into glutathione (**GSH**) or converted to taurine (**Tau**).

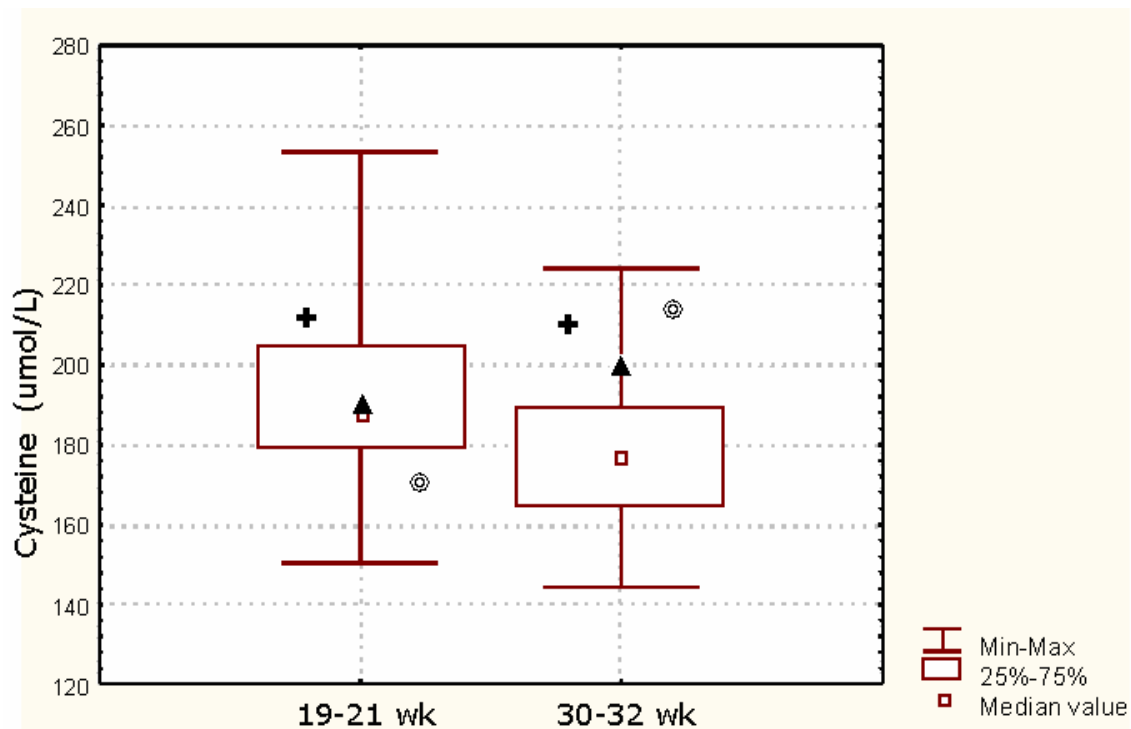


Figure 2 Values of plasma t-Cys of 3 women with preeclampsia plotted on the quartile graph of concentration of plasma t-Cys in uncomplicated pregnancies.

Table1 Clinical characteristics of 62 healthy pregnant women. Data are given as median (range).

Age (y)	27 (17, 35)
BMI preconceptionally (kg/m ²)	22,35 (18,1, 32,9)
Haematocrit 19-21 week	0,348 (0,287, 0,475)
Haematocrit 30-32 week	0,342 (0,296, 0,465)
Supplemented ^a (%)	80
Normotension (%)	100

^a supplementation with folates

Table 2 Values of plasma total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine, and glutathione in 62 prospectively studied uncomplicated pregnancies. Data are given as median (1st and 3rd quartile) and are expressed as $\mu\text{mol/L}$. t-test for dependent samples with separate variance estimate was used for analysis.

	19-21 wk	30-32 wk	p-value
cysteine	187.4 (178.7, 205.2)	176.1 (163.0, 189.4)	< 0.001
homocysteine	4.9 (4.1, 5.7)	4.6 (3.9, 5.6)	ns
cysteinylglycine	30.2 (27.4, 33.7)	31.6 (28.1, 34.8)	ns
glutathione	8.1 (7.5, 9.2)	7.9 (6.9, 8.7)	ns

Table 3 Values of plasma total cysteine of 3 women with pre-eclampsia ($\mu\text{mol/L}$).

patient No.	19-21 wk	30-32 wk
1	212.1	209.1
2	190.5	198.8
3	172.8	213.5

3.3.6

Coindience of oralfacial clefts and neural tube defects in Central European families

Připravovaná publikace do American Journal of Medical Genetics

Coincidence of orofacial clefts and neural tube defects in Central Europe

Kamila Veselá^{1,2}, Aleš Panczak^{2,3}, M. Boučková¹, M. Pavlíková⁴, A. Šantavá⁵, M. Havlovicová⁶, Š. Vejvarková⁶, J. Laštůvková⁷, J. Kofler⁷, V. Gregor⁸, M. Gailyová⁹, Š. Prášilová⁹, M. Kloubová¹⁰, J., D. Leznarová¹⁴, M. Peterka³, E. Šilhánová¹¹, K. Čutka¹⁰, J.Židovská², E. Jelínková¹³, J. Krofta¹², V. Kožich¹.

Rozpracovaná publikace do American Journal of Medical Genetics

¹ Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

² Institute of Biology and Medical Genetics, Charles University First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital Prague, Czech Republic

³ Clinic of Plastic Surgery, Královské Vinohrady Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

⁴ EuroMISE Center, Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

⁵ Department of Clinical Genetics, Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic

⁶ Institute of Biology and Medical Genetics, Motol Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

⁷ Department of Clinical Genetics, Masaryk Hospital, Ústí nad Labem, Czech Republic

⁸ Department of Clinical Genetics, Thomayer Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

⁹ Department of Clinical Genetics, Faculty Hospital, Brno, Czech Republic

¹⁰ Medical Genetics Center, České Budějovice, Czech Republic

¹¹ Department of Clinical Genetics, Faculty Hospital, Ostrava, Czech Republic

¹² Institute for the Care of Mother and Child, Prague, Czech Republic

¹³ Department of Clinical genetic, Prague 8, Czech Republic

¹⁴ Department of Clinical genetic, Brno, Czech Republic

Correspondence to Dr.Viktor Kožich, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic; Tel: +420-224967679, Fax: +420-224919392; E-mail: VKOZICH@LF1.CUNI.CZ.

Contract grant sponsor: Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic, grant contract number NM 6548.

Abstract

Key words:

Neural tube defect, orofacial clefts, folate metabolism, pedigree analysis, incidence

Abbreviations:

NTD - neural tube defect

OC – orofacial cleft

CL/P- cleft lip with or without cleft palate

FA- folic acid

Despite much work and many hypotheses, the etiology of neural tube defects (NTD) and orofacial clefts (OC) remains incompletely understood. Their incidence varies greatly even within restricted geographical areas, and it is recognized that a high proportion of NTDs affected fetuses are lost as spontaneous abortions. Nutritional factors, notably folic acid, form an important environmental component; genetic factors may prove involvement of folate metabolism (e.g. the folate receptor gene, MTHFR). Segmental developmental genes do not seem to play a major role outside specific syndromes and no clearly mendelian subset has yet been defined.

Neural tube defects are one of the most common and severe birth defects, e.g. its incidence in the U.S.A is approximately 10-20/10,000 live births [1, 2].

The majority of NTDs occurs sporadically (i.e. single occurrence in a family) and they are considered to be of multifactorial origin, involving combined interaction of multiple genes and environmental factors such as nutrition, drugs and socioeconomic status. [3] This etiologic heterogeneity is further manifested in substantial phenotypic heterogeneity, with a variety of defects associated with failed closure of the neural tube including, most usually, myelomeningocele (spina bifida and encephalocele) and anencephaly.

The effect of environmental factors is proved by the finding that folate treatment during the period of periconception reduces both occurrence and the recurrence of NTDs [4, 5]. With

respect to this evidence, many national boards approved folate supplementation regimes to the care for women in reproductive age. In the USA, there is a protocol of fortification of cereals with FA [6]. It is now accepted that periconceptional daily supplementation of folic acid reduces the risk of neural tube defects. [7, 8].

In countries with FA fortification of certain type of groceries the prevalence of NTD decreased in comparison with their prevalence of NTD before the fortification[9, 10].

In a number of mouse mutant models, the folate deficiency in mothers can be compensated for by folic acid supplementation reducing the risk of spina bifida, too. However, some other mouse NTD models show that both other metabolic pathways and nutritional supplement other than folate may influence frequency of spina bifida [11, 12]. Although the periconceptional folic acid supplementation has been identified as the major environmental influence on NTD risk, no genetic risk factors have been identified, which either fully explain the folic acid protective effect or define major genetic factors in humans. These candidate genes can be identified by homology with genes implicated from more than 40 mouse NTD models reported to date. More than 60 different genes have already been implicated in neural tube closure defects in mouse – among them those coding for transcriptional factors, cell adhesion molecules, proteins with mitotic function, and genes involved in various metabolic pathways [13].

The penetrance of such major gene mutations is substantially influenced by the genes-modifiers of the genetic background [14]. Second possibility of identifying candidate genes is likely to happen by genes implicated by biological functional plausibility. Studies of rare family cases - the risk of recurrence in a sibship is estimated to be 2 to 5 % [15] - may help in this kind of research.

In human genetic studies the attention was given to polymorfism 677C>T in *MTHFR* gene. The first study showed the association of this polymorfism with risk of NTD [16]. Other studies did not confirm it though (100,101). Another variant in the same gene 1298A>C was studied with controversial results, too. The last meta-analysis for both variants showed increasing risk of NTD for individuals with homozygote status in 677C>T and 1298A>C in *MTHFR* gene (OR 1,76; CI 1,45-2,14), resp. (OR 1,2; CI 1,04-1,61)[17].

Nonsyndromic orofacial clefts share some similar characteristics with NTDs, such as higher incidence (10-20/10 000), protective effect of folate supplementation, multifactorial etiology, and limited knowledge about genes involved in their raising [18, 19]. Shaw [20]collected, between 1987-1989, case-control data that showed risk reductions among infants and fetuses

whose mothers consumed vitamins. Odds ratios were similar for cleft lip with or without cleft palate (CP/P) and NTD, i.e. 2.9 and 3.1, respectively.

Mice deficient in the folic acid-binding protein one gene (*Folbp1*) display multiple developmental abnormalities; nullizygote embryos exhibit open cranial neural tube defects and also craniofacial abnormalities, such as cleft lip and palate. Impairment of *Folbp1* gene function adversely influences the expression of several critical signaling molecules [21] [22]. In another folic acid deficient mouse model [23]. ICR female mice were put on a diet containing no FA and including 1% succinyl sulfathiazole (SS) for 4 weeks before mating. Controlled mice were fed with either: 1) FA and 1% SS [+SS only diet]; 2) FA [normal diet]; or 3) a breeding diet. Reproductive outcome of the dams fed by a folic acid deficient diet and 1% succinyl sulfathiazole was poor with increased fetal deaths, decreased fetal weight, and delays in palate and heart development [23]. For NTD as well, the population studies regarding molecular markers in OC, gave the most attention to polymorphism 677C>T in *MTHFR* gene. The last meta-analysis inclusive of 400 affected persons evaluate the risk for orofacial cleft in homozygotes TT as almost unincreased (OR 1,08; CI 0,78-1,5). [17]

In the Czech Republic, during 15 years (between 1983 and 1997), the mean incidence of CL/P in Bohemia was 18.6 per 10 000 newborns. Paradoxically, the districts with a higher or lower birth rate demonstrated a lower (with mean 16.2/10 000) or higher incidence of CL/P (mean was 19.2/10 000)[24]. A retrospective demographic-epidemiological study of the nationwide register of inborn defects shows the overall incidence of neural tube defects (anencephaly, spina bifida, encephalocele) in the Czech Republic between 1961 and 1999 was evaluated as 8.42/10000 [25].

In a broader biochemically oriented study of folate metabolic pathways in sporadic cases of NTDs, we encountered few familial cases of NTD, but we quite often met families whose NTD were combined with OCs or other inborn errors in closer or further relatives. That is why we, in this separate communication, would like to analyze all these data purely from the epidemiological and population genetic points of view and demonstrate that these findings are not random. This way, we aimed to support the opinion that both these abnormalities share the same genetic mechanisms.

Material and methods

Pedigrees grouping

We investigated pedigrees of women with family history of neural tube defect (NTD). We studied cases of NTD in 326 families, being archived at 11 departments of clinical genetics

in different regions of the Czech Republic. We searched for additional developmental defects in families. As a control group of pedigrees served those where women had genetic consultation indicated for i) having their pregnancies at the age of 35 and more or ii) for occurrence of Huntington disease in the family or iii) for metabolic disease in family. Exclusive criterion for the control group was a genetic consultation for orofacial cleft in the family. We studied 428 control pedigrees that met this criterion. We inspected data about their relatives to calculate incidence of OC in this group.

The study was approved by Ethics Committee of Charles University-1st Faculty of Medicine.

Statistics

Data from individual genetics departments have been processed in two ways. For basic orientation and calculation of odds ratio (OR) we considered every family as an individual / isolated union, and specific variable there was the simple appearance of the abnormality (NTD, OC) in families regardless of the number of affected individuals.

For calculations of OR, we compared the incidence of OC/NTD in families consulted because of NTD in family history with those families indicated to consultation for other than cleft defects (Huntington disease, maternal age at the term etc.).

We compared our findings with population incidence of these defects published in literature. For that purpose, we had to recount number of individuals found with defect in relation to total number of surveyed individuals either from affected or from “control” families. For the purpose we even considered individual relatives as independent persons; the cleft defects are here so sporadic that we can permit this simplification.

We had at our disposal the total number of individuals in investigated pedigree in each of all (n = 326) families with developmental defect (OC or NTD). But, in control families, we were not able to establish precisely the total number of individuals in families. For this, the extent of control families was estimated. Our colleagues at 11 regional clinical genetic departments were asked to enumerate the size of pedigree in ten randomly chosen among “their” families. Thus, we counted the weighted average from 110 families in total. The total number of control pedigrees (n = 428) was multiplied by this average size of pedigree.

Results

We searched for additional developmental defects in families consulted for NTD or control families consulted for non-NTD and non-OC reasons. Among 326 NTD families we found 14 pedigrees where occurrence of NTD was combined with orofacial clefts (see Table 1 and 2).

In the control group of 428 pedigrees (without NTD case and primarily non-indicated to consultation for OC) we found 6 families with OCs in family history, and 4 families with NTD.

We compared results in these two groups and we found that in families with single occurrence of NTD there is statistically higher incidence of orofacial clefts (OR 2.9, CI 95% 1.1-7.5; $p = 0.027$). Consistently with other studies, we confirmed the fact that the occurrence of NTD in families where one such defect have already been known is significantly higher than in control families without this stressfull history (OR 6.9, CI 95% 2.4-20.2; $p = 0.0001$). For confirmation of source credibility we made a wider analysis of groups with regard to total number of individuals in groups (see Table 1 and 2).

Table 1: Occurrence of OC in NTDs family and in control group

	Number of persons	Number of OC persons	Incidence
Occurrence of OC in Czech	538	1	0,00186
Pedigree with OC	10269	14	0,00136
Control pedigree	10538	6	0,00057

Table 2: Occurrence of NTD in NTDs family and in control group

	Number of persons	Numer of NTD persons	Incidence
Occurrence if NTD in Czech	1188	1	0,00084
Pedigree with NTD	10269	22	0,00214
Control pedigree	10538	4	0,00038

Discussion:

Neural tube defects and cleft lip with or without cleft palate (CL/P) belong to common congenital anomalies. The overall birth prevalence of both is between 10 and 20/10000, but especially for CL/P the differences between populations/ethnics is well documented (being highest for populations of Asian descents, intermediate for those of Caucasian origin, and lowest for populations of African descent). This fact well reflects the differences in genetic

background on expression of this multifactorial disease being under polygenic control. But individual genes are not yet identified in detail, at least in humans [1, 2, 26, 27].

Classes of genes that have been found to be associated with mouse NTDs include those coding for transcriptional factors, cell adhesion molecules, protein with mitotic function, and genes involved in various metabolic pathways [13].

The penetrance of such gene mutations is at a high degree depending on the genetic background[14, 28, 29]

In our study we found statistically significant association between occurrence of NTD and OC. The families with single NTD case have three times higher risk of occurrence of another OC than families without this family history.

The validity of these data was analysed by relating the occurrence of defects on all individuals in the group. From our study result that occurrence of NTD and of OC in control group (not consulted for family history of this affections) is by half (for NTD) and as far as two-third (for OC) lower than recently published incidence for Czech Republic.

This may reflect that in control families (not consulted for OC/NTD) the awareness of these affect is lower because the defects are less discussed in comparison with families where the knowledge of severe developmental defects (OC/NTD) is quite relatively recent and probably often discussed. The reason of this discrepancy might be the fact that OC is less serious defect which can be corrected by plastic surgery, and, moreover, cleft palate is not visible and even close-relatives may not learn about it.

Citation:

1. KA Volcik, SH Blanton, MC Kruzel, IT Townsend, GH Tyerman, RJ Mier, H Northrup: Testing for genetic associations in a spina bifida population: analysis of the HOX gene family and human candidate gene regions implicated by mouse models of neural tube defects. *Am J Med Genet* 2002, 110:203-7.
2. KA Volcik, SH Blanton, MC Kruzel, IT Townsend, GH Tyerman, RJ Mier, H Northrup: Testing for genetic associations with the PAX gene family in a spina bifida population. *Am J Med Genet* 2002, 110:195-202.
3. LR Campbell, DH Dayton, GS Sohal: Neural tube defects: a review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. *Teratology* 1986, 34:171-87.
4. AE Czeizel, I Dudas: Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992, 327:1832-5.
5. NJ Wald, A Hackshaw, R Stone, J Densem: Serum alpha-fetoprotein and neural tube defects in the first trimester of pregnancy. MRC Vitamin Study Research Group. *Prenat Diagn* 1993, 13:1047-50.
6. FaD Administration: Food Standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regist* 1996, 61:8781-807.

7. LD Botto, CA Moore, MJ Khoury, JD Erickson: Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999, 341:1509-19.
8. RW Smithells, NC Nevin, MJ Seller, S Sheppard, R Harris, AP Read, DW Fielding, S Walker, CJ Schorah, J Wild: Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983, 1:1027-31.
9. GP Oakley, Jr., KN Bell, MB Weber: Recommendations for accelerating global action to prevent folic acid-preventable birth defects and other folate-deficiency diseases: meeting of experts on preventing folic acid-preventable neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004, 70:835-7.
10. M Dietrich, CJ Brown, G Block: The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr* 2005, 24:266-74.
11. M Carter, S Ulrich, Y Oofuji, DA Williams, ME Ross: Crooked tail (Cd) models human folate-responsive neural tube defects. *Hum Mol Genet* 1999, 8:2199-204.
12. ND Greene, AJ Copp: Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat Med* 1997, 3:60-6.
13. DM Juriloff, MJ Harris: Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 2000, 9:993-1000.
14. A Fleming, AJ Copp: A genetic risk factor for mouse neural tube defects: defining the embryonic basis. *Hum Mol Genet* 2000, 9:575-81.
15. ML McBride: Sib risk of anencephaly and spina bifida in British Columbia. *Am J Med Genet* 1979, 3:377-87.
16. NM van der Put, RP Steegers-Theunissen, P Frosst, FJ Trijbels, TK Eskes, LP van den Heuvel, EC Mariman, M den Heyer, R Rozen, HJ Blom: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995, 346:1070-1.
17. SVaL Botto: Neural tube defects, other congenital malformations and single nucleotide polymorphisms in 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase gene. In: *MTHFR polymorphisms and disease* Edited by PUaR Rozen. Georgetown: Landes bioscience; 2005.
18. AF Olshan, GM Shaw, RC Millikan, C Laurent, RH Finnell: Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for spina bifida and orofacial clefts. *Am J Med Genet A* 2005, 135:268-73.
19. H Zhu, S Curry, S Wen, NJ Wicker, GM Shaw, EJ Lammer, W Yang, T Jafarov, RH Finnell: Are the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT and BHMT2) genes risk factors for spina bifida and orofacial clefts? *Am J Med Genet A* 2005, 135:274-7.
20. GM Shaw, V Nelson, SL Carmichael, EJ Lammer, RH Finnell, TH Rosenquist: Maternal periconceptional vitamins: interactions with selected factors and congenital anomalies? *Epidemiology* 2002, 13:625-30.
21. LS Tang, RH Finnell: Neural and orofacial defects in Folp1 knockout mice [corrected]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003, 67:209-18.
22. LS Tang, DR Santillano, BJ Wlodarczyk, RC Miranda, RH Finnell: Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005, 135:48-58.
23. JM Burgoon, J Selhub, M Nadeau, TW Sadler: Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology* 2002, 65:219-27.
24. M Peterka, R Peterkova, M Tvrdek, J Kuderova, Z Likovsky: Significant differences in the incidence of orofacial clefts in fifty-two Czech districts between 1983 and 1997. *Acta Chir Plast* 2000, 42:124-9.

25. A Sipek, J Horacek, V Gregor, J Rychtarikova, D Dzurova, D Masatova: Neural tube defects in the Czech Republic during 1961-1999: incidences, prenatal diagnosis and prevalences according to maternal age. *J Obstet Gynaecol* 2002, 22:501-7.
26. MC Speer, EC Melvin, KD Viles, KA Bauer, E Rampersaud, C Drake, TM George, DS Enterline, JF Mackey, G Worley, et al: T locus shows no evidence for linkage disequilibrium or mutation in American Caucasian neural tube defect families. *Am J Med Genet* 2002, 110:215-8.
27. PH Joosten, M Toepoel, EC Mariman, EJ Van Zoelen: Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene predispose to human neural tube defects. *Nat Genet* 2001, 27:215-7.
28. FB Essien, MB Haviland, AE Naidoff: Expression of a new mutation (Axd) causing axial defects in mice correlates with maternal phenotype and age. *Teratology* 1990, 42:183-94.
29. T Gunther, M Struwe, A Aguzzi, K Schughart: Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development* 1994, 120:3119-30.

3.4. Příloha- tabulky

Tabulka č.6: Hladiny plasmatického homocysteinu nalačno- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Hcy nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	10,10	7,41	12,80
36-50 let	110	10,25	7,20	13,70
51 let a více	133	10,10	7,80	14,90
Celkem	285	10,10	7,34	14,10

Tabulka č.7:Hladiny plasmatického homocysteinu nalačno- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Hcy nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	8,50	5,77	11,71
36-50 let	120	8,45	6,3	11,42
51 let a více	136	9,60	7,05	13,85
Celkem	306	8,90	6,60	12,80

Tabulka č.8: Hladiny plasmatického homocysteinu po 6h.zátěži- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Hcy po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	33,45	27,64	52,38
36-50 let	110	35,35	26,30	49,14
51 let a více	133	34,40	25,60	48,02
Celkem	285	34,60	25,94	49,34

Tabulka č.9: Hladiny plasmatického homocysteinu po 6h.zátěži- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Hcy po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	32,55	22,47	49,84
36-50 let	120	33,00	23,38	49,86
51 let a více	136	39,15	28,55	61,65
Celkem	306	35,90	24,75	58,00

Tabulka č.10: Hladiny plasmatického cysteinu nalačno- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Cys nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	275,1	242,9	322,6
36-50 let	110	304,2	266,4	339,0
51 let a více	133	317,3	271,1	363,7
Celkem	285	307,6	263,0	352,1

Tabulka č.11: Hladiny plasmatického cysteinu nalačno-ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Cys nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	262,3	232,4	301,0
36-50 let	120	281,4	238,2	319,3
51 let a více	136	311,4	264,6	370,4
Celkem	306	290,4	245,6	354,6

Tabulka č.12: Hladiny plasmatického cysteinu po 6h zátěži- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Cys po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	264,7	226,9	288,7
36-50 let	110	289,0	255,0	321,4
51 let a více	133	302,9	253,5	355,3
Celkem	285	289,6	249,7	338,8

Tabulka č.13: Hladiny plasmatického cysteinu po 6h zátěži- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

Cys po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	234,6	199,3	273,1
36-50 let	120	259,8	223,8	300,3
51 let a více	136	289,3	244,4	341,8
Celkem	306	268,5	221,0	322,1

Tabulka č. 14: Hladiny plasmatického cysteinylglycinu nalačno- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

CGL nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	37,1	31,5	45,3
36-50 let	110	40,6	32,8	48,3
51 let a více	133	38,9	32,3	49,8
Celkem	285	39,3	32,3	48,4

Tabulka č.15: Hladiny plasmatického cysteinylglycinu nalačno- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

CGL nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	30,2	25,8	37,2
36-50 let	120	32,7	26,7	37,2
51 let a více	136	34,3	27,7	42,6
Celkem	306	33,3	26,8	40,8

Tabulka č.16: Hladiny plasmatického cysteinylglycinu po 6h. zátěži- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

CGL po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	31,25	26,45	38,00
36-50 let	110	34,00	27,90	41,21
51 let a více	133	33,10	25,72	41,94
Celkem	285	33,00	26,4	41,3

Tabulka č.17: Hladiny plasmatického cysteinylglycinu po 6h. zátěži- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

CGL po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	23,35	19,27	29,31
36-50 let	120	24,80	19,70	31,63
51 let a více	136	27,15	21,3	34,05
Celkem	306	25,40	20,40	33,10

Tabulka č.18: Hladiny plasmatického glutathionu nalačno- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

GSH nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	12,85	8,97	21,03
36-50 let	110	11,15	6,60	22,71
51 let a více	133	10,10	5,30	18,04
Celkem	285	10,80	5,94	20,40

Tabulka č.19: Hladiny plasmatického glutathionu nalačno- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

GSH nalačno	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	13,10	7,07	20,91
36-50 let	120	11,80	5,80	20,47
51 let a více	136	11,60	6,40	19,05
Celkem	306	11,70	6,35	20,30

Tabulka č.20: Hladiny plasmatického glutathionu po 6h. zátěži- muži
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

GSH po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	42	12,55	7,16	20,51
36-50 let	110	10,45	5,77	20,17
51 let a více	133	8,50	4,74	16,08
Celkem	285	9,80	5,50	19,40

Tabulka č.21: Hladiny plasmatického glutathionu po 6h. zátěži- ženy
(koncentrace uváděna v $\mu\text{mol/l}$)

GSH po zátěži	N	Medián	10% kvantil	90% kvantil
Do 35 let	50	10,55	6,72	20,04
36-50 let	120	10,25	5,29	19,39
51 let a více	136	9,80	5,60	16,75
Celkem	306	10,10	5,50	18,55

Tabulka č. 22: Koncentrace folátů v plazmě muži
(koncentrace uvedeny v nmol/l)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	42	8,45	18,19	12,35
36-50 let	110	8,88	26,37	15,60
51 let a více	133	7,74	25,34	14,00
Celkem	285	8,12	25,51	14,30

Tabulka č. 23: Koncentrace folátů v plazmě ženy
(koncentrace uvedeny v nmol/l)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	50	8,89	18,50	13,35
36-50 let	120	9,19	22,92	14,70
51 let a více	136	8,60	33,90	15,09
Celkem	306	8,80	25,65	14,60

Tabulka č. 24: Koncentrace folátů v erytrocytech muži
(koncentrace uvedeny v nmol/ml)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	42	557,1	1052,1	717,5
36-50 let	110	523,4	1155,8	795,0
51 let a více	133	527,4	1077,6	721,0
Celkem	285	527,5	1105,2	745,5

Tabulka č. 25: Koncentrace folátů v erytrocytech ženy
(koncentrace uvedeny v nmol/ml)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	50	470,2	1297,4	688,0
36-50 let	120	504,0	1136,1	720,5
51 let a více	136	438,0	1195,2	742,0
Celkem	306	458,2	1199,6	720,0

Tabulka č. 26: Koncentrace vitamínu B6 – muži
(koncentrace uvedeny v $\mu\text{g/l}$)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	42	6,8	20,5	12,0
36-50 let	110	5,8	23,8	11,6
51 let a více	133	4,2	18,7	9,0
Celkem	285	4,8	21,2	10,6

Tabulka č. 27: Koncentrace vitamínu B6 – ženy
(koncentrace uvedeny v $\mu\text{g/l}$)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	50	5,5	19,4	9,6
36-50 let	120	4,8	16,9	9,1
51 let a více	136	4,2	18,1	9,7
Celkem	306	4,5	18,2	9,3

Tabulka č. 28: Koncentrace vitamínu B12 – muži
(koncentrace uvedeny v pmol/l)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	42	175,2	395,1	255,5
36-50 let	110	172,4	453,5	285,0
51 let a více	133	155,6	414,8	244,0
Celkem	285	167,4	427,3	263,5

Tabulka č. 29: Koncentrace vitamínu B12 – ženy
(koncentrace uvedeny v pmol/l)

	N	10% kvantil	90% kvantil	Medián
Do 35 let	50	169,9	484,3	266,5
36-50 let	120	195,0	463,1	300,6
51 let a více	136	169,0	455,1	297,5
Celkem	306	177,5	468,6	298,1

Tabulka č. 30: Vyhledávání rodin s vícečetným výskytem rozštěpové vady

- multiplexové a kontrolní rodiny- přehled

VVV v rodině	sledované rodiny n=494	kontroly n=428
1x DNT	326	4
1x OR	0	6
1x GIT	169	1
DNT + DNT	27	0
DNT + OR	17	0
DNT + GIT	3	0
OR/GIT + GIT	4	0
Celkem multi rodin	51	

4. SOUHRN

1/ Vypracovali jsme podrobný protokol k provedení šestihodinového zátěžového testu s L-methioninem. Tento test je nyní snadno reprodukovatelný a může sloužit k diagnostice poruch metabolismu homocysteinu na jiných pracovištích.

2/ Stanovili jsme věkově a pohlavně specifické referenčních rozmezí vybraných aminothiolů ve zdravé české populaci.

3/ Vyhodnotili jsme akutní nežádoucí účinky i dlouhodobý efekt navozené hyperhomocysteinemie a prokázali klinickou bezpečnost methioninového zátěžového testu. Lze shrnout, že methioninový zátěžový test může být považován za bezpečnou proceduru, i když u některých osob vede k přechodným zdravotním obtížím.

4/ Sledovali jsme asociaci pěti běžných polymorfismů v různých genech metabolismu homocysteinu a pěti pathogenních mutací v *CBS* genu s rizikem ischemické choroby srdeční. Významným zjištěním je, že přítomnost 844ins68bp alely je protektivním faktorem při vzniku a rozvoji nemoci (OR=0.56, 95%CI=0.35-0.90), zvláště u lidí s nadváhou. Analýza na úrovni metabolitů prokázala významně nižší hladinu pozátěžovou hladinu homocysteinu S-adenosylhomocysteinu a vyšší hladinu S-adenosylmethioninu, poměru cysteinu k homocysteinu a poměru S-adenosylmethioninu k S-adenosylhomocysteinu oproti jedincům bez této varianty. Tyto změny svědčí pro zvýšenou transsulfuraci homocysteinu u těchto osob. Tyto výsledky podporují teorii o kauzalitě homocysteinu při vzniku ischemické choroby srdeční.

5/ Ověřili jsme biochemické účinky vitaminoterapie při modulaci mírné hyperhomocysteinemie v české populaci. Lze shrnout, že naše populace je srovnatelně vnímaná na léčbu jako jiné populace.

6/ Sledovali jsme vliv pěti běžných variant v různých genech metabolismu folátů na koncentraci folátů v krvi. Čtyři varianty jsou v české populaci funkčně neutrální, pouze pro 677C>T variantu v *MTHFR* genu jsme prokázali asociaci s nižší koncentrací folátů v plasmě ($p=0.04$ pro trend).

7/ Analyzovali jsme změny hladin aminothiolů v průběhu gravidity. Zjistili jsme, že během fyziologického těhotenství dochází k statisticky významnému poklesu hladin plasmatického cysteinu mezi 20. a 30. týdnem gravidity ($p < 0,001$). Plasmatické koncentrace hladin všech aminothiolů jsou významně nižší u těhotných žen při porovnání hladin s netěhotnými kontrolami

8/ Prostudováním 922 chorobopisů jsme zjistili významně vyšší výskyt OR v rodinách s DNT než v kontrolním souboru (OR 2.9, CI 95% 1.1-7.5; $p = 0.027$). To znamená, že rodiny s anamnézou DNT v rodině mají 3x vyšší riziko výskytu OR než rodiny anamnesticky němé. Tyto poznatky mohou mít dopad na určení rizika vrozených vývojových vad při genetickém poradenství.

9/ Pomocí vazebné analýzy jsme se snažili zjistit zda některá z vybraných variant v různých genech souvisejících s remethylací homocysteinu a metabolismem folátů je rizikovým faktorem pro rozštěpové vady obličeje a defekty neurální trubice. Pro účely této studie tak bylo provedeno více jak 10 000 analýz DNA. Vazebnou analýzou nebyla prokázána asociace žádného určitého genotypu s rozštěpovými vadami OR či DNT.

5. SEZNAM PUBLIKACÍ A PRESENTACÍ K TÉMATU

Publikace (IF; SCI, autocitace vyloučeny):

Víšková H., Veselá K., Janošíková B., Krijt J., Víšek JA., Calda P.: Plasma Cysteine Concentrations in Uncomplicated Pregnancies. *Fetal Dian Ther.*, 2007 22 (4): 254-258. (IF 0,89)

Veselá K., Pavlíková M., Janošíková B., Anděl M., Zvárová J., Hyánek J., Kožich V.: Genetic determinants of folate status in Central Bohemia. *Physiological Research* 2005 54 (3): 295-303. (IF 1,80; SCI 3)

Janošíková B., Pavlíková M., Kocmanová D., Vítová A., Veselá K., Krupková L., Kahleová R., Krijt J., Kraml P., Hyánek J., Zvárová J., Anděl M., Kožich V.: Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab.*, 2003 79 (3): 167-175. (2,68; SCI 8)

L. Krupková-Meixnerová, K. Veselá, A. Vítová, B. Janošíková, M. Anděl, V. Kožich: Methionine- loading test: evaluation of adverse effects safety in an epidemiological study, *Clinical Nutrition.*, 2002 21(2): 151-156. (IF 2,3; SCI 5)

A.Vítová, K.Veselá, L.Meixnerová, M.Anděl, V.Kožich. Methioninový zátěžový test; *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa* 2/2001, 119-123.

K. Veselá, P. Dlouhý : Kyselina listová a defekty neurální trubice in *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*, 1999; ročník 2, číslo 1: 32-38

Supplementa:

A.Vítová, K.Veselá, L.Meixnerová, V.Kožich, M.Anděl, P.Kraml, Hladiny homocysteinu a jeho metabolitů-cysteinu, cysteinylglycinu a glutathionu v plazmě a v plné krvi u diabetiků 2.typu s kardiovaskulárním onemocněním; *DMEV Supplementum* 1/2001, 54-55.

A.Vítová, V.Kožich, L.Meixnerová, K.Veselá, J.Krijt, M.Vacková, M.Anděl, P.Kraml, Hladina homocysteinu, cystathioninu, cysteinu a glutathionu v plasmě a plné krvi nalačno a po methioninové zátěži u diabetiků II.typu s ICHS v porovnání s pacienty s ICHS bez diabetu; *DMEV Supplement* 4/2001, 42-43.

Články připravované pro zahraniční odborné časopisy

Veselá K., Panczak A., Boučková M., Čutka K., Gailiová M., Gregor V., Havlovicová M., Jelínková E., Kloubová M., Kofer J., Krofta J., Laštůvková J., Leznarová D., Pavlíková M., Peterka P., Prášilová Š., Šantavá A., Šilhánová E., Vejvalková Š, Židovská J., Kožich V.: Coincidence of oralfacial clefts and neural tube defects in Central European families: *American Journal of Medical Genetics*.

Abstrakta posterů:

K. Veselá, L. Meixnerová, A. Vítová, V. Kožich, J. Hyánek, M. Vacková, J. Krijt, J. Svatoš, M. Anděl, P. Kraml: Účinnost vitaminoterapie při mírné hyperhomocysteinemii, Poster na 15. Pracovních dnech DMP, 17-19.5. 2000 Tále , Slovenská republika

L. Meixnerová, K. Veselá, V. Kožich, J. Svatoš, A. Vítová, M. Anděl, P. Kraml: Komplikace při zátěžovém testu s L-Methioninem, Poster na 15. Pracovních dnech DMP, 17-19.5. 2000 Tále , Slovenská republika

A. Vítová, M. Anděl, V. Kožich, P. Kraml, L. Meixnerová, K. Veselá, Hladiny celkového plasmatického Hcy nalačno a po 6 hodinové zátěži L-Methioninem u DM II typu, Poster na 36. Diabetologických dnech 16-15.4.2000 Luhačovice

K. Veselá, M. Meixnerová, B. Janošíková, J. Sokolová, E. Richterová, A. Vítová, M. Vacková, J. Krijt, M. Anděl: Vliv genetických faktorů na vznik mírné hyperhomocysteinemie, Poster na 16. Pracovních dnech DMP, 9-11.5.2001 Brno, Česká republika

A. Vítová, K. Veselá, L. Meixnerová, V. Kožich, M. Anděl, P. Kraml : Hladiny homocysteinu a jeho metabolitů- cysteinu, cysteinglycinu a glutathionu v plazmě a v plné krvi u diabetiků druhého typu s kardiovaskulárním onemocněním, Poster 37. Diabetické dny, Luhačovice 19-24.4. 2001

Janošíková B., Kylvoušková M., Kocmanová D., Sokolová J., Meixnerová L., Veselá K., Vítová A., Kožich V.: Variant alleles of the methionine cycle: association study in patients with coronary artery disease. Poster na 16. Pracovních dnech DMP, 9-11.5.2001 Brno, Česká republika

Janošíková B., Kylvoušková M., Kocmanová D., Sokolová J., Meixnerová L., Veselá K., Vítová A., Kožich V.: Variant alleles of the methionine cycle: association study in patients with coronary artery disease. Poster presentation, *10th International Congress of Human Genetics*, Vienna, Austria, 15.-19.5. 2001. Published in: *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 2001, supplement

Veselá K., Janošíková B., Richterová E., Hyánek J., Kožich V. Allelic variants in folate metabolism genes: determinants of folate concentrations Poster na 17. Pracovních dnech DMP, 15-17.5.2002 Piešťany Slovenská Republika

Veselá K., Janošíková B., Richterová E., Hyánek J., Kožich V. Allelic variants in folate metabolism genes: determinants of folate concentrations Poster na konferenci: Vitamíny 2002, 3-5.9. 2002, Pardubice

Kožich V., Martásek P., Veselá K., Krupková L., Krijt J.: Endothelial responses to methionine-loading test. Oral presentation, *40th Annual Symposium SSIEM*, Dublin, Ireland, 3.-6.9.2002

K. Veselá, M. Boučková, B. Janošíková, E. Richterová, A. Dutá, J. Krijt, J. Hyánek, J. Kuderová, J. Hrivňáková, V. Kožich: Metabolism of homocysteine and vitamins in patients with orofacial cleft Poster na 18. Pracovních dnech DMP, 28-29.5.2003 Slušovice

6. CITACE

1. Jacobsen, R.C.a.D., *Homocysteine in Health and Disease*. 2001: Cambridge University Press.
2. McCully, K.S., *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*. *Am J Pathol*, 1969. 56(1): p. 111-28.
3. McCully, K.S. and B.D. Ragsdale, *Production of arteriosclerosis by homocysteinemia*. *Am J Pathol*, 1970. 61(1): p. 1-11.
4. Boushey, C.J., et al., *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes*. *Jama*, 1995. 274(13): p. 1049-57.
5. Refsum, H., et al., *Homocysteine and cardiovascular disease*. *Annu Rev Med*, 1998. 49: p. 31-62.
6. Dudman, N.P., et al., *Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology*. *Arterioscler Thromb*, 1993. 13(9): p. 1253-60.
7. Campbell, L.R., D.H. Dayton, and G.S. Sohal, *Neural tube defects: a review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects*. *Teratology*, 1986. 34(2): p. 171-87.
8. Czeizel, A.E. and I. Dudas, *Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation*. *N Engl J Med*, 1992. 327(26): p. 1832-5.
9. Jacques, P.F., et al., *The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations*. *N Engl J Med*, 1999. 340(19): p. 1449-54.
10. van der Put, N.M., et al., *Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. 226(4): p. 243-70.
11. Nelen, W.L., *Hyperhomocysteinaemia and human reproduction*. *Clin Chem Lab Med*, 2001. 39(8): p. 758-63.
12. Wong, W.Y., et al., *Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia*. *Teratology*, 1999. 60(5): p. 253-7.
13. Kuller, L.H. and R.W. Evans, *Homocysteine, vitamins, and cardiovascular disease*. *Circulation*, 1998. 98(3): p. 196-9.
14. Šobra, J., *Hyperhomocysteinémie*. *Časopis lékařů českých*, 1996. 135(9): p. 266-269.
15. Simon, J., J. Racek, and H. Rosolova, *[Homocysteine, a less well-known risk factor in cardiac and vascular diseases]*. *Cas Lek Cesk*, 1996. 135(9): p. 263-5.
16. Hladovec, J., Z. Sommerova, and A. Pisarikova, *Homocysteinemia and endothelial damage after methionine load*. *Thromb Res*, 1997. 88(4): p. 361-4.
17. Rath, D., et al., *[Plasma homocysteine levels in patients with indications for cardiac revascularization]*. *Vnitr Lek*, 1998. 44(5): p. 255-8.
18. Bobak, M., et al., *[Antioxidants and cardiovascular diseases in the Czech population]*. *Vnitr Lek*, 1999. 45(6): p. 353-8.
19. Hyanek, J., et al., *[Diagnostic significance of mild hyperhomocysteinemia in a population of children with parents or grandparents who have peripheral or coronary artery disease]*. *Cas Lek Cesk*, 1999. 138(11): p. 333-6.
20. Simon, J., O. Mayer, Jr., and H. Rosolova, *[Effect of folates, vitamin B12 and life style factors on mild hyperhomocysteinemia in a population sample]*. *Cas Lek Cesk*, 1999. 138(21): p. 650-3.

21. Hyánek, J., et al., *[Homocysteinemia--its significance in gynecology and obstetrics]*. Ceska Gynekol, 2000. 65(6): p. 406-12.
22. Stulc, T., et al., *Folate supplementation prevents plasma homocysteine increase after fenofibrate therapy*. Nutrition, 2001. 17(9): p. 721-3.
23. Mayer, O., et al., *Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid: effects on homocysteine levels, coagulation status, and oxidative stress markers*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. 39(6): p. 851-7.
24. Melenovsky, V., et al., *Effect of folic acid on fenofibrate-induced elevation of homocysteine and cysteine*. Am Heart J, 2003. 146(1): p. 110.
25. Kožich V, K.J., Hyánek J, *Homocystein, geny a vitamíny: souvislost s kardiovaskulárnými onemocněními a komplikacemi těhotenství*. DMEV, 1999. 3: p. 113-120.
26. Racek, J. and M. Rackova, *[Less common risk factors for atherogenesis--homocysteine, lipoprotein (a) and C-reactive protein]*. Cas Lek Cesk, 2002. 141(19): p. 605-9.
27. Zak, A. and M. Zeman, *[Consequences of moderate hyperhomocysteinemia in internal medicine]*. Cas Lek Cesk, 2004. 143(6): p. 367-74.
28. Gaull, G., J.A. Sturman, and N.C. Raiha, *Development of mammalian sulfur metabolism: absence of cystathionase in human fetal tissues*. Pediatr Res, 1972. 6(6): p. 538-47.
29. Coughtrie, M.W., et al., *Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases*. Chem Biol Interact, 1998. 109(1-3): p. 3-27.
30. Andersson, A., et al., *Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization*. Clin Chem, 1993. 39(8): p. 1590-7.
31. Kang, S.S., P.W. Wong, and M. Norusis, *Homocysteinemia due to folate deficiency*. Metabolism, 1987. 36(5): p. 458-62.
32. Ford, E.S. and B.A. Bowman, *Serum and red blood cell folate concentrations, race, and education: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Clin Nutr, 1999. 69(3): p. 476-81.
33. Kang, S.S., P.W. Wong, and M.R. Malinow, *Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease*. Annu Rev Nutr, 1992. 12: p. 279-98.
34. Wu, L.L., et al., *Plasma homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease*. Clin Chem, 1994. 40(4): p. 552-61.
35. Franken, D.G., et al., *Prevalence of familial mild hyperhomocysteinemia*. Atherosclerosis, 1996. 125(1): p. 71-80.
36. Andersson, A., et al., *Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status*. Eur J Clin Invest, 1992. 22(2): p. 79-87.
37. Grubben, M.J., et al., *Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial*. Am J Clin Nutr, 2000. 71(2): p. 480-4.
38. De Bree, A., et al., *Alcohol consumption and plasma homocysteine: what's brewing?* Int J Epidemiol, 2001. 30(3): p. 626-7.
39. de Bree, A., et al., *Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y*. Am J Clin Nutr, 2001. 73(6): p. 1027-33.
40. van Guldener, C. and K. Robinson, *Homocysteine and renal disease*. Semin Thromb Hemost, 2000. 26(3): p. 313-24.

41. Clarke, R., et al., *Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease*. *N Engl J Med*, 1991. 324(17): p. 1149-55.
42. Robinson, K., et al., *Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease*. *Circulation*, 1995. 92(10): p. 2825-30.
43. Ubbink, J.B., et al., *The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism*. *J Clin Invest*, 1996. 98(1): p. 177-84.
44. Bosy-Westphal, A., et al., *Plasma folate but not vitamin B(12) or homocysteine concentrations are reduced after short-term vitamin B(6) supplementation*. *Ann Nutr Metab*, 2001. 45(6): p. 255-8.
45. Ganong, W., *Přehled lékařské fyziologie*, ed. J. Herget. 1995, Jinočany: HaH.
46. Ubbink, J.B., et al., *Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans*. *J Nutr*, 1994. 124(10): p. 1927-33.
47. Bronstrup, A., et al., *Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B-12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women*. *Am J Clin Nutr*, 1998. 68(5): p. 1104-10.
48. Tamura, T. and M.F. Picciano, *Folate and human reproduction*. *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(5): p. 993-1016.
49. Selhub, J. and J.W. Miller, *The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine*. *Am J Clin Nutr*, 1992. 55(1): p. 131-8.
50. Shane, B., *Folate metabolism*, in *Folic acid metabolism in health and disease*, M. Picciano, E. Stokstad, and J. Gregory, Editors. 1990, Wiley-Liss, Inc.: New York. p. 65-78.
51. Fowler, B., *The folate cycle and disease in humans*. *Kidney Int Suppl*, 2001. 78: p. S221-9.
52. Selhub, J., et al., *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*. *Jama*, 1993. 270(22): p. 2693-8.
53. Chambers, J.C., et al., *Plasma homocysteine concentrations and risk of coronary heart disease in UK Indian Asian and European men*. *Lancet*, 2000. 355(9203): p. 523-7.
54. Verhoef, P., et al., *Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate*. *Am J Epidemiol*, 1996. 143(9): p. 845-59.
55. Carmel, R., et al., *Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities*. *Am J Clin Nutr*, 1999. 70(5): p. 904-10.
56. Osganian, S.K., et al., *Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children: Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health*. *Jama*, 1999. 281(13): p. 1189-96.
57. Selhub, J., et al., *Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations*. *Ann Intern Med*, 1999. 131(5): p. 331-9.
58. *Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration*. *Bmj*, 1998. 316(7135): p. 894-8.
59. Kraus, J.P., et al., *The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms*. *Genomics*, 1998. 52(3): p. 312-24.

60. Sebastio, G., et al., *The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations*. Am J Hum Genet, 1995. 56(6): p. 1324-33.
61. Romano, M., et al., *Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine Beta -synthase gene*. J Biol Chem, 2002. 277(46): p. 43821-9.
62. Tsai, M.Y., et al., *High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene*. Am J Hum Genet, 1996. 59(6): p. 1262-7.
63. Kluijtmans, L.A., et al., *A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene*. Biochem Mol Med, 1997. 62(1): p. 23-5.
64. Wang, X.L., et al., *Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population*. Atherosclerosis, 1999. 146(1): p. 133-40.
65. Franco, R., et al., *The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine beta-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis*. Haematologica, 1998. 83(11): p. 1006-8.
66. Aras, O., et al., *Influence of 699C-->T and 1080C-->T polymorphisms of the cystathionine beta-synthase gene on plasma homocysteine levels*. Clin Genet, 2000. 58(6): p. 455-9.
67. De Stefano, V., et al., *Linkage disequilibrium at the cystathionine beta synthase (CBS) locus and the association between genetic variation at the CBS locus and plasma levels of homocysteine*. The Ears II Group. European Atherosclerosis Research Study. Ann Hum Genet, 1998. 62(Pt 6): p. 481-90.
68. Lievers, K.J., et al., *Cystathionine beta-synthase polymorphisms and hyperhomocysteinaemia: an association study*. Eur J Hum Genet, 2003. 11(1): p. 23-9.
69. Frosst, P., et al., *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat Genet, 1995. 10(1): p. 111-3.
70. van der Put, N.M., et al., *Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease*. Qjm, 1997. 90(8): p. 511-7.
71. Kluijtmans, L.A., et al., *Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease*. Am J Hum Genet, 1996. 58(1): p. 35-41.
72. Gallagher, P.M., et al., *Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation*. Circulation, 1996. 94(9): p. 2154-8.
73. Verhoef, P., et al., *The 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease*. Atherosclerosis, 1997. 132(1): p. 105-13.
74. Brattstrom, L., et al., *Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis*. Circulation, 1998. 98(23): p. 2520-6.
75. Ray, J.G., D. Shmorgun, and W.S. Chan, *Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. 32(2): p. 51-8.
76. van der Put, N.M., et al., *A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?* Am J Hum Genet, 1998. 62(5): p. 1044-51.

77. Weisberg, I., et al., *A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity.* Mol Genet Metab, 1998. 64(3): p. 169-72.
78. Chango, A., et al., *The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects.* Br J Nutr, 2000. 83(6): p. 593-6.
79. Chango, A., et al., *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort.* Br J Nutr, 2000. 84(6): p. 891-6.
80. Leclerc, D., et al., *Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders.* Hum Mol Genet, 1996. 5(12): p. 1867-74.
81. Christensen, B., et al., *Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects.* Am J Med Genet, 1999. 84(2): p. 151-7.
82. Wilson, A., et al., *A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida.* Mol Genet Metab, 1999. 67(4): p. 317-23.
83. O'Leary, V.B., et al., *Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association.* Mol Genet Metab, 2005. 85(3): p. 220-7.
84. Brown, C.A., et al., *A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease.* J Cardiovasc Risk, 2000. 7(3): p. 197-200.
85. Devlin, A.M., et al., *Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia.* Hum Mol Genet, 2000. 9(19): p. 2837-44.
86. Lievers, K.J., et al., *Influence of a glutamate carboxypeptidase II (GCPII) polymorphism (1561C-->T) on plasma homocysteine, folate and vitamin B(12) levels and its relationship to cardiovascular disease risk.* Atherosclerosis, 2002. 164(2): p. 269-73.
87. Afman, L.A., F.J. Trijbels, and H.J. Blom, *The H475Y polymorphism in the glutamate carboxypeptidase II gene increases plasma folate without affecting the risk for neural tube defects in humans.* J Nutr, 2003. 133(1): p. 75-7.
88. Vargas-Martinez, C., et al., *The glutamate carboxypeptidase gene II (C>T) polymorphism does not affect folate status in the Framingham Offspring cohort.* J Nutr, 2002. 132(6): p. 1176-9.
89. Yang-Feng, T.L., et al., *Assignment of the human folate transporter gene to chromosome 21q22.3 by somatic cell hybrid analysis and in situ hybridization.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. 210(3): p. 874-9.
90. Chango, A., et al., *A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia.* Mol Genet Metab, 2000. 70(4): p. 310-5.
91. Morin, I., et al., *Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk.* Mol Genet Metab, 2003. 79(3): p. 197-200.
92. Shaw, G.M., et al., *Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida.* Am J Med Genet, 2002. 108(1): p. 1-6.

93. Shaw, G.M., et al., *Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects*. *Am J Epidemiol*, 2003. 158(8): p. 747-52.
94. Yap, S. and E. Naughten, *Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control*. *J Inherit Metab Dis*, 1998. 21(7): p. 738-47.
95. Mudd S, L.H.a.K.J., *Disordes of transsulfuration*, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, e.a. Scriver C, Editor. 2001, McGraw-Hill: New York. p. 2007-2056.
96. Orendac, M., et al., *[Clinical picture of homocystinuria with cystathionine beta-synthase deficiency in 19 Czech and Slovak patients]*. *Cas Lek Cesk*, 2000. 139(16): p. 500-7.
97. Hague, W.M., *Homocysteine and pregnancy*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003. 17(3): p. 459-69.
98. Brattstrom, L. and D.E. Wilcken, *Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect?* *Am J Clin Nutr*, 2000. 72(2): p. 315-23.
99. Selhub, J., et al., *Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification*. *Public Health Rev*, 2000. 28(1-4): p. 117-45.
100. Nygard, O., et al., *Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study*. *Jama*, 1995. 274(19): p. 1526-33.
101. Anderson A, H.B., Barttstrim L, Isaksson A, *Decrease serum homocysteine in pregnancy*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1992. 30: p. 377-9.
102. Dekker, G.A., et al., *Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia*. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. 173(4): p. 1042-8.
103. Wu, L.L. and J.T. Wu, *Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker*. *Clin Chim Acta*, 2002. 322(1-2): p. 21-8.
104. Sun, C.F., et al., *Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: a potential new tumor marker*. *Clin Chim Acta*, 2002. 321(1-2): p. 55-62.
105. Jacques, P.F., et al., *Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort*. *Am J Clin Nutr*, 2001. 73(3): p. 613-21.
106. Quinn, C.T., et al., *Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer*. *J Clin Oncol*, 1997. 15(8): p. 2800-6.
107. Hultberg, B., A. Andersson, and M. Arnadottir, *Reduced, free and total fractions of homocysteine and other thiol compounds in plasma from patients with renal failure*. *Nephron*, 1995. 70(1): p. 62-7.
108. Bostom, A.G., et al., *Folate status is the major determinant of fasting total plasma homocysteine levels in maintenance dialysis patients*. *Atherosclerosis*, 1996. 123(1-2): p. 193-202.
109. Bostom, A.G., et al., *Hyperhomocysteinemia and traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease patients on dialysis: a case-control study*. *Atherosclerosis*, 1995. 114(1): p. 93-103.
110. Gregor, P.W.a.P., *Vnitřní lékařství II, Kardiologie*. 1997, Praha: Karolinum.
111. Scheuner, M.T., *Genetic predisposition to coronary artery disease*. *Curr Opin Cardiol*, 2001. 16(4): p. 251-60.

112. Malinow, M.R., et al., *Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease*. *Atherosclerosis*, 1996. 126(1): p. 27-34.
113. Graham, I.M., et al., *Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project*. *Jama*, 1997. 277(22): p. 1775-81.
114. Kang, S.S., et al., *Protein-bound homocyst(e)ine. A possible risk factor for coronary artery disease*. *J Clin Invest*, 1986. 77(5): p. 1482-6.
115. Cleophas, T.J., et al., *Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis*. *Am J Cardiol*, 2000. 86(9): p. 1005-9, A8.
116. Verhoef, P., et al., *A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke*. *Stroke*, 1994. 25(10): p. 1924-30.
117. Nygard, O., et al., *Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 1997. 337(4): p. 230-6.
118. Morrison, H.I., et al., *Serum folate and risk of fatal coronary heart disease*. *Jama*, 1996. 275(24): p. 1893-6.
119. Silberberg, J.S., et al., *Association between plasma folate and coronary disease independent of homocysteine*. *Am J Cardiol*, 2001. 87(8): p. 1003-4; A5.
120. Ueland, P.M., et al., *The controversy over homocysteine and cardiovascular risk*. *Am J Clin Nutr*, 2000. 72(2): p. 324-32.
121. Vollset, S.E., et al., *Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study*. *Am J Clin Nutr*, 2001. 74(1): p. 130-6.
122. Refsum, H., et al., *The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease*. *J Nutr*, 2006. 136(6 Suppl): p. 1731S-1740S.
123. Selhub, J., *Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism*. *J Nutr Health Aging*, 2002. 6(1): p. 39-42.
124. Toole, J.F., et al., *Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial*. *Jama*, 2004. 291(5): p. 565-75.
125. Bonaa, K.H., et al., *Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2006. 354(15): p. 1578-88.
126. Lonn, E., et al., *Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease*. *N Engl J Med*, 2006. 354(15): p. 1567-77.
127. Yang, Q., et al., *Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002*. *Circulation*, 2006. 113(10): p. 1335-43.
128. Loscalzo, J., *The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia*. *J Clin Invest*, 1996. 98(1): p. 5-7.
129. McCully, K.S., *Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis*. *Ann Clin Lab Sci*, 1993. 23(6): p. 477-93.
130. Tsai, J.C., et al., *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(14): p. 6369-73.
131. Stamler, J.S., et al., *Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen*. *J Clin Invest*, 1993. 91(1): p. 308-18.
132. Mudd, S.H., et al., *The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency*. *Am J Hum Genet*, 1985. 37(1): p. 1-31.

133. de Franchis, R., et al., *Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia*. *Thromb Haemost*, 2000. 84(4): p. 576-82.
134. Haukkamaa, L., et al., *Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia*. *Am J Cardiol*, 2004. 93(6): p. 805-8.
135. Kaaja, R., T. Kinnunen, and R. Luoto, *Regional differences in the prevalence of pre-eclampsia in relation to the risk factors for coronary artery disease in women in Finland*. *Eur Heart J*, 2005. 26(1): p. 44-50.
136. Pouta, A., et al., *Manifestations of metabolic syndrome after hypertensive pregnancy*. *Hypertension*, 2004. 43(4): p. 825-31.
137. Manten, G.T., et al., *Risk factors for cardiovascular disease in women with a history of pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction*. *Hypertens Pregnancy*, 2007. 26(1): p. 39-50.
138. Catov, J.M., et al., *Risk of early or severe preeclampsia related to pre-existing conditions*. *Int J Epidemiol*, 2007.
139. Bodnar, L.M., et al., *Prepregnancy body mass index and the occurrence of severe hypertensive disorders of pregnancy*. *Epidemiology*, 2007. 18(2): p. 234-9.
140. Stone, C.D., et al., *The combined effect of maternal smoking and obesity on the risk of preeclampsia*. *J Perinat Med*, 2007. 35(1): p. 28-31.
141. Walker, M.C., et al., *Changes in homocysteine levels during normal pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 180(3 Pt 1): p. 660-4.
142. Rajkovic, A., P.M. Catalano, and M.R. Malinow, *Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia*. *Obstet Gynecol*, 1997. 90(2): p. 168-71.
143. Raijmakers, M.T., et al., *Plasma thiol status in preeclampsia*. *Obstet Gynecol*, 2000. 95(2): p. 180-4.
144. Kamudhamas, A., et al., *Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction?* *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 191(2): p. 563-71.
145. Kupferminc, M.J., et al., *Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations*. *Obstet Gynecol*, 2000. 96(1): p. 45-9.
146. Powers, R.W., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia*. *J Soc Gynecol Investig*, 1999. 6(2): p. 74-9.
147. El-Khairi, L., et al., *Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study*. *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(2): p. 467-72.
148. Veselá K, D.P., *Kyselina listová a defekty neurální trubice*. *DMEV*, 1999. 2(1): p. 32-38.
149. Kirke, P.N., J.L. Mills, and J.M. Scott, *Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects*. *Nutrition*, 1997. 13(11-12): p. 994-5.
150. Smithells, R.W., S. Sheppard, and C.J. Schorah, *Vitamin deficiencies and neural tube defects*. *Arch Dis Child*, 1976. 51(12): p. 944-50.
151. Smithells, R.W., et al., *Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences*. *Lancet*, 1983. 1(8332): p. 1027-31.
152. Laurence, K.M., et al., *Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1981. 282(6275): p. 1509-11.
153. Council, H.C.F.A.N., *Follow-up report on the relationship between folic acid intake and neural tube defects*. 1993: p. 33.
154. Botto, L.D., et al., *Neural-tube defects*. *N Engl J Med*, 1999. 341(20): p. 1509-19.

155. *Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. Lancet, 1991. 338(8760): p. 131-7.*
156. Administration, F.a.D., *Food Standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Fed Regist, 1996. 61: p. 8781-807.*
157. Dietrich, M., C.J. Brown, and G. Block, *The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. J Am Coll Nutr, 2005. 24(4): p. 266-74.*
158. Oakley, G.P., Jr., K.N. Bell, and M.B. Weber, *Recommendations for accelerating global action to prevent folic acid-preventable birth defects and other folate-deficiency diseases: meeting of experts on preventing folic acid-preventable neural tube defects. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2004. 70(11): p. 835-7.*
159. De Wals, P., et al., *Trend in prevalence of neural tube defects in Quebec. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003. 67(11): p. 919-23.*
160. van der Put, N.M., et al., *Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring. J Mol Med, 1996. 74(11): p. 691-4.*
161. Mornet, E., et al., *Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. Hum Genet, 1997. 100(5-6): p. 512-4.*
162. Melnick, M. and M.L. Marazita, *Neural tube defects, methylenetetrahydrofolate reductase mutation, and north/south dietary differences in China. J Craniofac Genet Dev Biol, 1998. 18(4): p. 233-5.*
163. van der Put, N.M., et al., *Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet, 1995. 346(8982): p. 1070-1.*
164. Kirke, P.N., et al., *Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. Bmj, 2004. 328(7455): p. 1535-6.*
165. Richter, B., et al., *Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. J Hum Genet, 2001. 46(3): p. 105-9.*
166. Parle-McDermott, A., et al., *Analysis of the MTHFR 1298A-->C and 677C-->T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. J Hum Genet, 2003. 48(4): p. 190-3.*
167. Tolarova, M., *Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. Lancet, 1982. 2(8291): p. 217.*
168. Shaw, G.M., et al., *Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. Lancet, 1995. 346(8972): p. 393-6.*
169. Werler, M.M., et al., *Multivitamin supplementation and risk of birth defects. Am J Epidemiol, 1999. 150(7): p. 675-82.*
170. Loffredo, L.C., et al., *Oral clefts and vitamin supplementation. Cleft Palate Craniofac J, 2001. 38(1): p. 76-83.*
171. Hayes, C., et al., *Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. Am J Epidemiol, 1996. 143(12): p. 1229-34.*
172. Mills, J.L., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. Am J Med Genet, 1999. 86(1): p. 71-4.*
173. Gaspar, D.A., et al., *Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. Am J Med Genet, 1999. 87(2): p. 197-9.*

174. Martinelli, M., et al., *C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers?* Am J Med Genet, 2001. 98(4): p. 357-60.
175. Malinow, M.R., A.G. Bostom, and R.M. Krauss, *Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association.* Circulation, 1999. 99(1): p. 178-82.
176. Klerk, M., et al., *MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis.* Jama, 2002. 288(16): p. 2023-31.
177. Tsai, M.Y., et al., *Relation between plasma homocysteine concentration, the 844ins68 variant of the cystathionine beta-synthase gene, and pyridoxal-5'-phosphate concentration.* Mol Genet Metab, 1999. 67(4): p. 352-6.
178. Dekou, V., et al., *Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men.* Thromb Haemost, 2001. 85(1): p. 67-74.
179. Kang, S.S., et al., *Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase.* Am J Hum Genet, 1988. 43(4): p. 414-21.
180. Tucker, K.L., et al., *Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study.* J Nutr, 1996. 126(12): p. 3025-31.
181. Tice, J.A., et al., *Cost-effectiveness of vitamin therapy to lower plasma homocysteine levels for the prevention of coronary heart disease: effect of grain fortification and beyond.* Jama, 2001. 286(8): p. 936-43.
182. Koch, H.G., et al., *The redox status of aminothiols as a clue to homocysteine-induced vascular damage?* Eur J Pediatr, 1998. 157 Suppl 2: p. S102-6.
183. Stehouwer, C.D. and C. van Guldener, *Does homocysteine cause hypertension?* Clin Chem Lab Med, 2003. 41(11): p. 1408-11.
184. Bellamy, M.F., et al., *Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults.* Circulation, 1998. 98(18): p. 1848-52.
185. Chambers, J.C., et al., *Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy.* Circulation, 1999. 99(9): p. 1156-60.
186. Lange, H., et al., *Folate therapy and in-stent restenosis after coronary stenting.* N Engl J Med, 2004. 350(26): p. 2673-81.
187. Loscalzo, J., *Adverse effects of supplemental L-arginine in atherosclerosis: consequences of methylation stress in a complex catabolism?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(1): p. 3-5.
188. Boger, R.H., et al., *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(6): p. 1557-64.
189. D'Angelo, A. and J. Selhub, *Homocysteine and thrombotic disease.* Blood, 1997. 90(1): p. 1-11.
190. Benes, P., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, type II diabetes mellitus, coronary artery disease, and essential hypertension in the Czech population.* Mol Genet Metab, 2001. 73(2): p. 188-95.
191. Prochazka, M., et al., *[Occurrence of gene mutations in factor V Leiden, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase in patients with pre-eclampsia].* Ceska Gynkol, 2003. 68(3): p. 162-6.

192. Guinotte, C.L., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T variant modulates folate status response to controlled folate intakes in young women.* J Nutr, 2003. 133(5): p. 1272-80.
193. Jacob, N., et al., *Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients.* Atherosclerosis, 1999. 146(1): p. 53-9.
194. El-Khairi, L., et al., *Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project.* Circulation, 2001. 103(21): p. 2544-9.
195. Peterka, M., et al., *Significant differences in the incidence of orofacial clefts in fifty-two Czech districts between 1983 and 1997.* Acta Chir Plast, 2000. 42(4): p. 124-9.
196. Sipek, A., et al., *Neural tube defects in the Czech Republic during 1961-1999: incidences, prenatal diagnosis and prevalences according to maternal age.* J Obstet Gynaecol, 2002. 22(5): p. 501-7.
197. Botto, S.V.a.L., *Neural tube defects, other congenital malformations and single nucleotide polymorphisms in 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase gene, in MTHFR polymorphisms and disease*, P.U.a.R. Rozen, Editor. 2005, Landes bioscience: Georgetown.
198. Carter, M., et al., *Crooked tail (Cd) models human folate-responsive neural tube defects.* Hum Mol Genet, 1999. 8(12): p. 2199-204.
199. Tang, L.S., et al., *Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies.* Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2005. 135(1): p. 48-58.
200. Tang, L.S. and R.H. Finnell, *Neural and orofacial defects in Folp1 knockout mice [corrected].* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003. 67(4): p. 209-18.
201. Uhlmann, D.B.a.J.S.a.W., *A guide to genetic counseling.* 1998, New York: Wiley-Liss.